UNIVERSITÉ DE CAEN
N° D'ORDRE 39

FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE CAEN

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Louis BOURGAIN

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE (PHARMACIE)
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY (SCIENCES)
DIPLÔMÉ D'HYGIÈNE ET BACTÉRIOLOGIE
DIPLÔMÉ DE SÉROLOGIE

1re Thèse. — RECHERCHES SUR LES INHIBITEURS DES ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LES FERMENTS LACTIQUES.

2e Thèse. — *Proposition soumise par la Faculté :*

STÉROLS DOUÉS D'ACTIVITÉS HORMONALES SEXUELLES DU CORTEX SURRÉNAL, DU PLACENTA ET DES GONADES. TRAITEZ DE LA FÉCONDATION, DE LA GESTATION, DE LA PARTURITION ET DE LA LACTATION. EXAMINEZ SUCCINCTEMENT LA BIOGENÈSE ET DISCUTEZ DES VICARIANCES FONCTIONNELLES.

présentées et soutenues le 28 juin 1960 devant la Commission d'examen

MM. JACQUET ..... *Président.*
RYBAK ..... } *Suffragants.*
BINET ..... }

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1960

UNIVERSITÉ DE CAEN
N° D'ORDRE 39

FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE CAEN

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Louis BOURGAIN

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE (PHARMACIE)
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY (SCIENCES)
DIPLÔMÉ D'HYGIÈNE ET BACTÉRIOLOGIE
DIPLÔMÉ DE SÉROLOGIE

1re Thèse. — RECHERCHES SUR LES INHIBITEURS DES ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LES FERMENTS LACTIQUES.

2e Thèse. — *Proposition soumise par la Faculté :*

STÉROLS DOUÉS D'ACTIVITÉS HORMONALES SEXUELLES DU CORTEX SURRÉNAL, DU PLACENTA ET DES GONADES. TRAITEZ DE LA FÉCONDATION, DE LA GESTATION, DE LA PARTURITION ET DE LA LACTATION. EXAMINEZ SUCCINCTEMENT LA BIOGENÈSE ET DISCUTEZ DES VICARIANCES FONCTIONNELLES.

présentées et soutenues le 28 juin 1960 devant la Commission d'examen

MM. JACQUET ..... *Président.*
RYBAK ..... } *Suffragants.*
BINET ..... }

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1960

UNIVERSITÉ DE CAEN
FACULTÉ DES SCIENCES

ANNÉE SCOLAIRE 1959-1960

PERSONNEL ENSEIGNANT DE LA FACULTÉ

MM.	LOZAC'H	Doyen - Professeur (Chimie).
	DANGEARD	Professeur (Géologie).
	SCHERER	Professeur (Physique générale).
	APÉRY	Professeur (Calcul différentiel et intégral).
	JACQUET	Professeur (Microbiologie).
	BOCQUET	Assesseur - Professeur (Zoologie).
	COLOMBANI	Professeur (Physique).
Mme	WALTER-LÉVY	Professeur (Chimie).
MM.	PITOT	Professeur (Botanique).
	CAMPBELL	Professeur (Mécanique rationnelle).
	BACHELET	Professeur (Chimie).
	MALLIAVIN	Professeur (Mathématiques).
	VIALLE	Professeur (Chimie).
	LE ROUX	Professeur (Physique appliquée).
	COJAN	Professeur (Physique).
	PALLU DE LA BARRIÈRE	Professeur (Mathématiques).
	REY	Professeur sans chaire (Zoologie).
	PHAM	Professeur sans chaire (Mathématiques).

MM.	GRAFF	Maître de Conférences (Chimie).
	ROMANET	Maître de Conférences (Chimie).
	MONIER	Maître de Conférences (Minéralogie).
	GIACOMO	Maître de Conférences (Physique).
	BINET	Maître de Conférences (Botanique).
	CONIA	Maître de Conférences (Chimie).
	PAREYN	Maître de Conférences (Géologie).
	DOGUET	Maître de Conférences (Biologie végétale).
	DELLOUE	Maître de Conférences (Physique).
	CABANNES	Maître de Conférences (Physique).
	RYBAK	Maître de Conférences (Physiologie animale).
	MABBOUX-STROMBERG	Maître de Conférences (Physique).
	GIRAULT	Maître de Conférences (Mathématiques).
	SCHAAL	Maître de Conférences (Chimie).
	NATAF	Maître de Conférences (Mathématiques).
	THUREAU	Maître de Conférences (Electronique).
	GEFFROY	Maître de Conférences (Mathématiques).
	BARRAT	Maître de Conférences (Physique).

M.	CAUCAL	Secrétaire Principal des Facultés.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

MEIS ET AMICIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. MAYER

PROFESSEUR D'ANATOMIE GÉNÉRALE ET D'HISTOLOGIE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Qui, avec une très aimable spontanéité, nous a apporté une aide immense dans la préparation de notre deuxième thèse.

Nous le remercions bien sincèrement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR F. TAYEAU

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

ASSESSEUR DU DOYEN

A qui nous sommes uni par une profonde amitié, depuis plus de trente années.

Ce Maître, dont la science remarquable n'a d'égale que son dévouement sans bornes, nous a toujours témoigné une bienveillante attention, et nous sommes très touché de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à nos recherches.

Nous lui adressons tous nos plus vifs remerciements.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BINET

DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE CAEN

En le remerciant respectueusement d'avoir examiné notre travail et d'avoir bien voulu accepter de siéger dans notre Jury, malgré les multiples occupations qui l'accaparent.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RYBAK

DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE CAEN

Dont la haute autorité, associée à une grande courtoisie, nous a apporté une aide à la fois efficace et irremplaçable.

Nous n'oublierons jamais l'extrême rigueur scientifique de ses propos, dont nous avons bénéficié.

Nous le prions de bien vouloir accepter notre déférente reconnaissance.

Tout ceci nous a incité à entreprendre l'étude des facteurs qui agissent sur la biologie des ferments lactiques soumis à l'action antibiotique. On pouvait se demander, en effet, si ces espèces, à supposer qu'elles soient astreintes aux mêmes coupures de cycles que les autres variétés microbiennes habituellement testées, étaient en mesure de retrouver un développement normal à l'aide de différents inhibiteurs d'antibiotiques. Il n'entre pas dans nos intentions d'essayer tous les inhibiteurs possibles; nous avons d'emblée, éliminé tous ceux qui n'agissent que par destruction physique (acidité, précipitation) ou enzymatique (pénicillinase, streptomycinase) des antibiotiques; et encore, nous n'avons retenu que quelques-uns parmi ceux qui s'avèrent capables d'intervenir dans les systèmes métaboliques; pour ce faire, les doses des antibiotiques utilisés (pénicilline, streptomycine, chloramphénicol, auréomycine) ont été employées dans chaque cas à des concentrations franchement inhibitrices, et nos essais ont toujours été pratiqués en milieu liquide. Nous avons recherché, également, si certains caractères physiologiques naturels, voire acquis, de quelques souches peuvent s'opposer à l'action antibiotique, ces caractères traduisant un potentiel cellulaire de déviations métaboliques propres à soustraire le micro-organisme à l'antibiose.

Dans la réalisation de ces différents travaux, nous avons été constamment guidé par MM. les Professeurs Jacquet et Rybak, de l'Université de Caen, qui n'ont pas ménagé leur temps pour nous fournir des documents, et pour nous aider à interpréter nos expériences. Grâce à l'aimable concours de ces conseillers sûrs et bienveillants, nous avons pu mener à bien le travail que nous présentons aujourd'hui.

Toutes les souches employées répondent à la définition des ferments lactiques vrais, suivant Orla-Jensen [108], c'est-à-dire qu'elles ne sporulent pas, produisent principalement de l'acide lactique, requièrent une nutrition azotée complexe, sont Gram positives, anaérobies facultatives, ne produisent pas de catalase.

PREMIÈRE PARTIE

RÉSUMÉ DES TRAVAUX ANTÉRIEURS

La recherche des inhibiteurs d'antibiotiques étant dirigée par la connaissance que nous pouvons avoir des mécanismes d'action de ces substances, il nous paraît nécessaire de rappeler l'état actuel des principaux résultats connus sur ce mode d'action, ainsi que les divers essais d'inhibiteurs qui se sont révélés encourageants.

CHAPITRE PREMIER

MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES

Nous passerons ici rapidement en revue les modes d'action de quatre antibiotiques majeurs : pénicilline, streptomycine, chloramphénicol, auréomycine.

Le lecteur intéressé par les détails techniques pourra consulter avec fruit les études d'ensemble que MACHEBŒUF et GROS [84, 85], UMBREIT [145], GORET, JOUBERT et SAURAT [45], BRISOU [15], HAHN [53] ont consacré à ce sujet; ces articles, pourvus, en général, d'abondantes références bibliographiques, permettent de retrouver rapidement la source des résultats expérimentaux grâce auxquels on a pu, pour chaque antibiotique, édifier la trame de ses points d'action.

Ce qui frappe, avant tout, dans l'effet antibiotique, c'est son pouvoir extraordinaire; et l'on conçoit très bien que les nécessités thérapeutiques aient amené les chercheurs à se tourner davantage vers la découverte de nouveaux antibiotiques que vers la recherche de leurs mécanismes d'action; le cas, typique, de la pénicilline, en est une illustration : découverte par FLEMING en 1929, elle fut isolée en 1940, et les premiers travaux relatifs à son intervention dans les processus biochimiques datent de 1947.

Il est à peine besoin de souligner combien cette étude est fascinante. Le caractère foudroyant des propriétés antibiotiques vis-à-vis des microbes devait inciter les chercheurs à explorer les divers métabolismes fondamentaux nécessaires au maintien de la vie microbienne afin de déceler celui ou

ceux qui se montreraient le plus vulnérable. Nous résumerons ces recherches et les résultats obtenus à propos de chaque antibiotique que, par souci de clarté, nous examinerons séparément.

PÉNICILLINE

Nombreux sont les travaux relatifs au mécanisme d'action de la pénicilline; Machebœuf et Gros [84, 85] sont parmi les premiers chercheurs qui se sont penchés sur ce problème : la réaction de Stickland, de désamination couplée des amino-acides, chez le *Clostridium sporogenes,* a été la première réaction biochimique inhibée par la pénicilline, que l'on ait observée; mais ce résultat, aussi remarquable fût-il, devait se révéler rapidement insuffisant, car cette réaction, spéciale au *Clostridium,* ne se retrouve pas chez d'autres espèces. C'est alors que Gale [42] devait ouvrir une nouvelle voie par son observation fondamentale : les bactéries Gram positives, qui sont sensibles à la pénicilline, concentrent en leur sein l'acide glutamique, tandis que les bactéries Gram négatives ne captent pas cet amino-acide, et en effectuent la synthèse; or Gale remarqua l'abaissement, par la pénicilline, de la concentration de l'acide glutamique chez les bactéries Gram positives; de plus, toujours selon Gale [41], cette captation ne peut s'effectuer que si ces bactéries disposent d'une source d'énergie comme le glucose ou l'acide adénosine-triphosphorique; la pénicilline agirait-elle sur cet acide ? Des expériences vinrent prouver qu'il n'en était pas ainsi; et que l'acide adénosine-triphosphorique conservait son rôle de donneur d'acide phosphorique dans les processus de phosphorylations de la glycolyse; il fallait donc orienter les recherches sur un autre terrain. On sait que l'acide ribonucléique s'accumule aux points d'élaboration protéique, et que leurs synthèses ont des relations communes; partant de cette idée Machebœuf étudia l'influence de la pénicilline dans le catabolisme des mononucléotides et constata que les bactéries soumises à l'action de la pénicilline perdaient leur pouvoir d'oxydation du ribose des nucléotides.

La pénicilline agirait sur les constituants d'un système enzymatique appartenant au métabolisme des ribonucléotides ou de leurs dérivés cataboliques immédiats, les ribonucléosides; la pénicilline bloque la diastase qui assure, chez la

bactérie, la synthèse des mononucléotides au niveau du clivage ester phosphorique-ribose et base azotée.

Or, un ribonucléotide, l'acide adénylique, ou un de ses dérivés est un cofacteur de la réaction de Stickland; on retrouve ainsi l'explication de l'inhibition de cette réaction par la pénicilline. La transpeptidation et la synthèse des protides sont également troublées (Hotchkiss [63]). Chez l'animal, l'hydrolyse des mononucléotides s'effectue différemment, et se situe entre l'acide phosphorique et le pentose, d'où il découle que la pénicilline offre une excellente tolérance thérapeutique.

Pandalai et Georges [115], puis Faguet [35] ont apporté un argument suggestif en montrant qu'il suffit d'ajouter au milieu de culture 3 mg par ml d'acide ribonucléique pour empêcher l'action antibiotique d'une dose létale de pénicilline. Cavalitto [19] inactive la pénicilline par la cystéine, le glutathion et d'autres thiols; on pourrait penser, alors, que la pénicilline agirait sur un système enzymatique soufré, en relation avec le métabolisme ribonucléique, mais les travaux de Krampitz et Werkman [75] ont démontré que la pénicilline n'avait pas d'action sur les enzymes à groupe —SH actif.

L'interférence de la pénicilline avec des substances à groupements —SH actifs semble, cependant, assez controversée. Le trouble du métabolisme des ribonucléotides, par la pénicilline, retentit également sur le potentiel rédox des milieux de culture (Malmgren et Heden [88]); en effet, si les ribonucléotides s'accumulent au milieu de la phase de latence et au début de la phase de croissance logarithmique lorsque le rH_2 s'abaisse, la pénicilline, par son influence sur le métabolisme de ces composés, élève le rH_2, par voie de conséquence (Drouhet et Kepes [30, 31], Dufrénoy et Pratt [33]).

Il faut noter aussi que le catabolisme des acides désoxyribonucléiques n'est pas influencé par la pénicilline (Krampitz et Werkman [75]).

Enfin, il ne faut pas exclure l'action de la pénicilline sur la constitution de la membrane bactérienne; en effet, selon Lederberg [78], la pénicilline inhiberait une polymérase intervenant dans la formation de la membrane, ce qui amènerait la fragilité osmotique de la bactérie; de plus, sa toxicité spécifique vis-à-vis des microbes découlerait du fait que les cellules animales ne possèdent pas ce type de membrane (Park et Strominger [117]). Cette électivité ne fait que renforcer les merveilleuses propriétés de la pénicilline.

Comme on le voit, cet aperçu des points d'action de la pénicilline démontre amplement combien passionnantes sont ces recherches qui, peu à peu, lèvent le voile sur une connaissance encore plus approfondie du premier antibiotique connu.

STREPTOMYCINE

Si la pénicilline s'était bien montrée un antibiotique d'une puissance surprenante, il n'en était pas moins vrai que des germes, en particulier Gram négatifs, échappaient à son action; c'est alors qu'une autre substance, présentant une aire d'activité plus étendue, fut découverte en 1944 par Waksman : la streptomycine.

Comme la pénicilline, la streptomycine agit sur le catabolisme des ribomononucléotides (Machebœuf [84]), mais, cette fois, sur des constituants de systèmes métaboliques différents : la streptomycine bloque la dépolymérisation des acides ribonucléiques par la ribonucléodépolymérase, la dépolymérisation devant aboutir à un mononucléotide. De plus, la streptomycine forme des complexes avec l'acide nucléique au niveau des groupements guanidiques, ce qui est confirmé par les expériences avec l'arcaïne. La formation des complexes entre la streptomycine et l'acide ribonucléique a été particulièrement étudiée par Gros et coll. [49, 50] et l'acide nucléique inclus dans ces complexes n'est pas attaquable par la dépolymérase spécifique [50]; des complexes insolubles de la streptomycine se forment également avec des composés macromoléculaires à *p*H isoélectrique acide [128]; de plus, la streptomycine agglutine certaines émulsions microbiennes en eau distillée seulement, ce phénomène étant différent de l'action proprement antibiotique [47]; des sels divers, la cystéine, l'antigène 0 empêchent cette agglutination [48], et il suffit d'ajouter une faible quantité d'acide ribonucléique dans un milieu de culture contenant de la streptomycine pour en supprimer l'action, même antibiotique [129].

En bloquant les mononucléotides, la streptomycine provoque une interférence avec la réaction de Stickland, et, également, une désorganisation dans l'élaboration des protides à laquelle participent les acides nucléiques. L'activité de l'antibiotique se manifeste, aussi, dans d'autres métabolismes : il inhibe la diamine-oxydase (Owen et coll. [112]), interfère avec le métabolisme de l'inositol (Paine et Lipmann [114]) et

du pantothénate de sodium (Lichstein et Gilfillan [83]), bloque la condensation de l'acide oxalacétique et de l'acide pyruvique (Umbreit [146]); si l'on ajoute encore à ces activités de la streptomycine son action sur les cofacteurs de transport d'hydrogène (exemple : sur le diphosphopyridine nucléotide) dépistée dans certains métabolismes bactériens, et son inhibition dans la formation d'enzymes adaptatifs (travaux cités par Brisou [15]), on aura une idée de la grande diversité réactionnelle de la streptomycine; et nous serions incomplet, si nous omettions de mentionner que les combinaisons de la streptomycine avec les acides nucléiques et les nucléoprotides altèrent la charge de surface des bactéries (Mc Quillen [99]).

En face d'un nombre aussi imposant de propriétés, une question essentielle se pose : comment un organisme animal peut-il supporter, sans dommages, une thérapeutique à base de streptomycine ? A la vérité, la streptomycine ne présente pas le même caractère d'innocuité que la pénicilline, car la streptomycine attaque directement les polynucléotides, et elle inhibe la pseudocholinestérase plasmatique (travaux cités par Machebœuf et Gros [84]); toutefois, les tissus animaux, et la surface des mitochondries, n'absorbent pas toute la streptomycine présente (Umbreit et Tonhazy [147]), bien que parfois la thérapeutique nécessiterait une pénétration plus grande de l'antibiotique (Mackaness et Smith [86]). De l'ensemble des travaux consacrés aux points d'action de la streptomycine, il se dégage une impression de polyvalence et de variété que ne nous avait pas donnée la pénicilline; aussi, faut-il apprécier pleinement les efforts des chercheurs qui, dans ce domaine difficile, sont parvenus à jeter un peu de lumière sur ces problèmes.

CHLORAMPHÉNICOL

Avec le chloramphénicol, découvert en 1947 par Burkholder et Gottlieb, s'ouvrait une nouvelle étape de lutte antimicrobienne, aussi bien contre les germes à Gram positif que contre ceux à Gram négatif.

Cependant, malgré les nombreuses recherches concernant le mode d'action du chloramphénicol, l'ensemble de toutes les observations n'a pas atteint, dans l'état actuel de nos connaissances, un caractère homogène satisfaisant, et la relation que nous en ferons paraîtra, sans aucun doute, assez disparate.

L'activité du chloramphénicol est diminuée en présence de phénylalanine, de tyrosine, ou de tryptophane (Woolley [155]); le tryptophane surajouté viendrait, somme toute, compenser le défaut de sa synthèse (Truhaut, Lambin et Boyer [143]).

D'autre part, la présence de phénylalanine, tryptophane, glycocolle, acide aspartique, acide para-aminobenzoïque, ne peut annuler l'effet inhibiteur du chloramphénicol d'après Hopps et coll. [60], car l'antibiotique n'agirait pas simplement comme antagoniste d'un acide aminé. Déjà, Swenseid et coll. [140] pensaient que le chloramphénicol empêchait la synthèse des protides.

Korotjaev [74] n'attribue pas d'activité antibiotique du chloramphénicol envers les enzymes lipolytiques, mais, plutôt, à l'égard des endoprotéases bactériennes, et à des concentrations bactériostatiques, les processus de glycolyse sont arrêtés; la carboxylase pyruvique est inhibée (Martin-Hernandez [93]); et les estérases sont bloquées, lorsque l'antibiotique se trouve en concentration dix fois supérieure à la dose létale (Smith et coll. [137]).

La synthèse des systèmes enzymatiques oxydant l'acide acétique et l'acide oxalacétique est inhibée (Grunberger, Hess et Sorm [52]), comme celle, induite, des systèmes enzymatiques oxydant le lactose (Hahn et Wisseman [54]). Si, pour Collins et coll. [24], le chloramphénicol se fixerait sur les acides nucléiques qui ne pourraient plus servir ainsi à l'élaboration protidique, la synthèse des acides nucléiques, eux-mêmes, ne serait pas modifiée (Gale et Folkes [43]).

De cette énumération peut-être brutale des points d'action du chloramphénicol, on retiendra cependant l'affinité que semble présenter cet antibiotique pour le métabolisme des amino-acides et l'élaboration protidique; à cela il faut ajouter le caractère fortement électronégatif du chloramphénicol, dont l'influence dans les systèmes oxydo-réducteurs doit être manifeste.

AURÉOMYCINE

Chronologiquement, l'auréomycine, isolée en 1948 par Duggar, arrive au quatrième rang dans l'ordre de la découverte des antibiotiques.

L'auréomycine ou chlortétracycline fait partie, à côté, entre

autres, de la terramycine et de la tétracycline, du groupe des tétracyclines; ces antibiotiques ont un mode d'action semblable, où il faut signaler, en tout premier lieu, la facilité qu'ils présentent à se complexer avec les métaux, d'où il en résulte pour les enzymes une privation d'ions nécessaires à leur activité (Albert et Ress [1]).

L'auréomycine formerait des complexes qui inhibent les enzymes des phosphorylations, et des oxydations; il se produirait une inhibition de la phosphorylation aérobie (Brody et Bain [16], Van Meter et Oleson [148]). La construction de ces complexes peut être levée si l'on carbonise préalablement l'auréomycine (Zimmerman et Humoller [157]), ou si l'on ajoute dans le milieu du magnésium (Saz et Slie [131]). D'une manière générale, c'est au niveau de la production des enzymes que l'auréomycine se montre particulièrement toxique ainsi que Hahn et Wisseman [54] l'ont démontré pour les enzymes d'oxydation du lactose, du maltose, ou de l'arabinose; d'une façon plus générale, la synthèse des protides se trouve inhibée (Gale et Folkes [43]); ces dernières observations sont valables, également, pour le chloramphénicol, comme nous l'avons vu précédemment.

On s'est demandé, d'autre part, si l'auréomycine pouvait interférer avec l'action de diverses vitamines du groupe B, car divers faits expérimentaux le laissaient pressentir; en effet, comme pour le chloramphénicol, la carboxylase pyruvique, enzyme contenant de la thiamine, serait inhibée (Martin-Hernandez [94]); de leur côté, Osteux et coll. [109] ont montré que la biotine se révélait un anti-inhibiteur puissant contre l'inhibition de la pyruvique-hydrogène-lyase par l'antibiotique; Mondolfo et Mondolfo-Hounie [103] ont réussi à neutraliser partiellement son pouvoir bactériostatique par la nicotinamide, le pantothénate de calcium, et la thiamine. A première vue, il paraît difficile de donner une explication correcte de tous ces effets. Faudrait-il voir, dans cette action de certaines vitamines du groupe B, un rôle de suppléance co-enzymatique ?

En résumé, l'auréomycine, particulièrement envers les systèmes enzymatiques, apparaît douée de propriétés à la fois physico-chimiques et chimiques.

Après les sensationnelles découvertes de la pénicilline et de la streptomycine, il faut bien admettre que notre admiration se fut quelque peu émoussée à l'apparition du chloramphé-

nicol et de l'auréomycine, qui restent, cependant, des antibiotiques de très grande valeur et indispensables; il ne faut pas oublier, en effet, que chaque antibiotique réussit électivement dans une aire d'application appropriée.

Cette revue du mode d'action des quatre principaux antibiotiques montre bien qu'ils possèdent des points communs (intrusion de la pénicilline et de la streptomycine dans le métabolisme nucléique; influence du chloramphénicol et de l'auréomycine dans le métabolisme protidique), mais aussi particuliers (les points d'attaque nucléique de la pénicilline et de la streptomycine sont différents; complémentairement à une affinité enzymatique semblable à celle du chloramphénicol, l'auréomycine est capable de former des complexes). Ainsi s'explique la nécessité, en thérapeutique, d'utiliser plusieurs antibiotiques, chacun d'entre eux développant ses propres qualités.

CHAPITRE II

INHIBITION DES EFFETS ANTIBIOTIQUES

Toute offensive appelle une contre-offensive, et la mise au point d'une arme est-elle terminée que déjà, redoutant son agressivité, l'on recherche une parade efficace.

Il en est de même pour les antibiotiques; pour rendre aux microbes leur vitalité de nombreux procédés sont employés; nous nous attacherons, en ce qui nous concerne, à la recherche de ceux capables d'influencer un processus métabolique.

Ces tentatives de neutralisation des effets antibiotiques sont multiples, et, dans cette intention, de nombreux produits ont été employés; nous retiendrons ceux qui nous paraissent les plus typiques, c'est-à-dire ceux qui ont permis d'obtenir des résultats probants. Bien souvent, ces produits offrent une activité qui s'applique à plus d'un antibiotique, et certains d'entre eux présentent même un caractère de polyvalence; c'est pourquoi, il nous paraît plus logique de les énumérer un à un, en signalant leur efficacité, plutôt que de les grouper sous la rubrique d'un antibiotique donné.

Prendra place, également, dans ce chapitre un résumé des recherches effectuées en vue de transformer une souche sensible en souche résistante par le moyen de déviations métaboliques, en l'absence de l'antibiotique : ce procédé peut, en effet, être considéré comme la mise en place *in vivo* de fonctions de neutralisation à l'égard des antibiotiques.

I. — MÉTABOLITES INHIBITEURS AJOUTÉS AU MILIEU DE CULTURE ET INTERVENTION DES VITAMINES

A. — Ribonucléinate de sodium.

L'action du ribonucléinate de sodium comme antipénicilline a été étudiée par Faguet [35]; utilisant la souche *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* Cheftel, cet auteur constate, qu'en eau peptonée glucosée, le nucléinate de sodium, à la dose de 1 p. 1.000, neutralise l'action antistaphylococcique de 0,17 unité internationale de pénicilline par centimètre cube de milieu; cette action est parfois faible, et, de plus, la phase de latence est plus longue que celle des cultures où le nucléinate a été remplacé par la pénicillinase, ainsi que des cultures sulfamidées dans lesquelles a été introduit de l'acide para-amino-benzoïque.

L'action du ribonucléinate de sodium a été très discutée; Pandalai et Georges [115] ainsi que Faguet affirment son efficacité, tandis que Frieden et Frazier [40] nient son intérêt en insistant sur son pouvoir extrêmement faible; reprenant la question Latterrade, Auger et Machebœuf [77] constatent que le ribonucléinate de sodium a bien, en milieu pénicilliné, une action favorisant la reprise de culture s'il est ajouté, avec l'antibiotique, au moment de l'ensemencement; mais, il est dépourvu d'action s'il est ajouté, avec l'antibiotique, quatre heures après l'ensemencement.

D'autre part, Rybak, Grumbach et Gros [129] inhibent la streptomycine par l'acide ribonucléique, et observent des résultats différents suivant la concentration en acide ribonucléique et en streptomycine. Ils obtiennent, en effet, une neutralisation chimique de la streptomycine si l'acide ribonucléique est ajouté dans le milieu à dose faible (0,5 ml d'une solution à 0,1 ou 0,01 mg par millilitre dans 5 ml, soit une concentration finale de 0,01 ou 0,001 mg par millilitre); mais, pour des concentrations finales plus fortes (0,25 et 1 mg par millilitre) à l'aide d'une solution plus concentrée (2,5 et 10 mg par millilitre), l'action de la streptomycine est renforcée, ceci étant dû à la redissolution du complexe streptomycine-acide ribonucléique, libérant la streptomycine.

Selon les auteurs, cette inactivation de la streptomycine par les acides nucléiques serait due à une affinité du type acide-base de la streptomycine basique envers des substances de poids moléculaire assez élevé à point iso-électrique faible.

B. — Cystéine.

A propos du mode d'action de la pénicilline, nous avons indiqué combien était controversée sa réactivité vis-à-vis des groupements —SH appartenant à des enzymes. Or, des composés qui contiennent des groupes sulfhydriles amortiraient son effet. C'est ainsi que Cavalitto [19], étudiant différentes substances à structure thiol, en vue de leur réaction sur les antibiotiques, constate que la cystéine, ses esters, et les bêta-amino et bêta-diméthylamino-éthane-thiols sont de bons inactiveurs de la pénicilline; au contraire, l'homocystéine, la N-acétyl-cystéine et le thioglycolate de sodium n'agissent que faiblement; de là, Cavalitto conclut que les composés sulfhydrilés contenant des groupes aminés au voisinage de —SH sont les plus actifs pour la pénicilline et, aussi, pour la streptomycine. L'auteur introduit, en milieu tamponné au phosphate, l'antibiotique et le composé sulfhydrilé pendant un temps déterminé à une température donnée et l'effet est mesuré par perte de l'activité de l'antibiotique en milieu gélosé avec *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*.

En utilisant la cystéine, le temps de réaction avec l'antibiotique est très court. En conséquence, Cavalitto suppose, dans sa discussion, que l'antibiotique pourrait réagir ainsi, non seulement, avec des groupements —SH des enzymes, mais aussi, peut-être, avec des groupements —SH de la cystéine provenant de chaînes polypeptidiques impliquées dans la synthèse des protides; et, ces groupes —SH actifs attirant l'antibiotique, pourraient tout aussi bien attirer l'inhibiteur.

Pour Bruni [17], la cystéamine inhibe de façon plus active que la cystéine l'activité de la pénicilline.

Cependant, par elle-même, la cystéine et certains de ses composés dérivés seraient défavorables à la croissance (Mac Laughan et Rogers [97] et Winsten et Murray [152]).

C. — Glutathion.

Cavalitto, que nous venons de citer, avait testé le glutathion, et avait observé que ce composé inactivait, aussi, la pénicilline et la streptomycine, mais, en un temps plus long que la cystéine; la pénicilline et la streptomycine présenteraient, donc, une affinité chimique envers le glutathion. Précisément, parmi les actions secondaires de la pénicilline, l'inhibition de la transpeptidation reposerait sur l'affinité chimique de la pénicilline pour le glutathion. Cette hypothèse n'est, cependant, pas vérifiée, puisque Samuel [130] n'a pas noté d'influence de la pénicilline sur la synthèse et la transformation du glutathion. Et voici un fait qui obscurcit tout essai d'explication rationnelle : Pratt [121], en effet, constate que de fortes concentrations de glutathion augmentent la sensibilité à la pénicilline. Dubnoff et Bartron [32] nous laissent quand même un espoir, puisque, d'après ces chercheurs, le glutathion, le glucose 6-phosphate, et la cobalamine agiraient favorablement sur les groupements —SH liés, activant parallèlement le pouvoir enzymatique.

Par ces divers travaux, parfois contradictoires, on se rend compte de la complexité du problème.

D. — Liquide sanguin.

L'application médicamenteuse des antibiotiques devait nécessairement amener les chercheurs à étudier le comportement du liquide sanguin (plasma, sérum) vis-à-vis de ces substances.

L'action de blocage du sérum sanguin envers les antibiotiques a été rapportée par plusieurs auteurs, dont les observations ont été reprises par Turpin et Velu [144] dans leur ouvrage sur la thérapeutique antibiotique. La pénicilline, la streptomycine, le chloramphénicol et l'auréomycine se trouveraient réversiblement bloqués par le sérum sanguin; des nombreux travaux consacrés à ce sujet, on peut dégager l'explication suivante, la plus généralement admise : l'antibiotique serait adsorbé par les protides plasmatiques; il n'y aurait ni combinaison, ni activation. Il a été démontré que la pénicilline marquée par S^{35} mélangée au sérum humain a pu être décelée dans l'albumine séparée dans les fractions électrophorétiques.

In vitro, les expériences relatives à l'effet anti-inhibiteur du sérum sanguin mettent en jeu une assez forte concentration de sérum : dans les milieux de culture, sérum et milieu se trouvent à parties égales.

Par exemple, pour la streptomycine, deux séries de tubes sont ensemencées d'une souche de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus,* chaque série contenant la même progression de quantités croissantes d'antibiotique, et, dans une série, on ajoute de l'eau physiologique stérile, tandis que, dans l'autre série, on ajoute la même quantité de sérum. On constate, alors, que dans la série de tubes contenant le sérum, le staphylocoque résiste à une plus forte dose de streptomycine; dans ces expériences, sérum et milieu se trouvent, bien entendu, en même quantité (Berkman, Housewright et Henry [9, 10, 11]).

Avec les protides sériques, la streptomycine formerait des complexes de type électrovalentiel (Tayeau et coll. [141]).

Cependant, Sevcik [136] a observé que les dimensions des zones d'inhibition de cultures de divers streptocoques sur plaques de gélose contenant des cupules d'antibiotiques ne différaient guère suivant que le milieu contenait, ou non, du sérum sanguin.

En thérapeutique, ce problème de l'influence des facteurs sanguins revêt une importance particulière : il faut que la concentration antibiotique dans le sang reste efficace.

E. — Complexes naturels

Après l'étude de l'influence du liquide sanguin sur les antibiotiques, il nous paraît naturel de passer maintenant à celle des complexes naturels; dans les milieux biologiques, les antibiotiques se trouvent mélangés à des composés très divers, et il importe de connaître leur action frénatrice éventuelle.

Foster et Pitillo [38], ajoutant, à un milieu de base, différents complexes naturels, tels que « Difco peptone », « Wilson liver B », « casamino-acids » ou « Anheuser-Bush basamine », ont constaté qu'en boîte de Pétri, *Escherichia coli* forme, en présence d'antibiotiques, des colonies plus nombreuses qu'en l'absence de ces complexes naturels. Selon ces auteurs, l'action de la « basamine », par exemple, ne peut être attribuée à sa teneur en cystéine (cf. action de la cystéine, d'après Cavalitto); la « basamine » ne détruirait pas les six différents antibiotiques testés qui sont : la pénicilline, la strep-

tomycine, l'auréomycine, le chloramphénicol, la terramycine, et la bacilline. L'action de ces « reversing substances » serait de faciliter la possibilité de l'organisme bactérien à survivre par des voies métaboliques dérivées.

Plus particulièrement pour le chloramphénicol, Arora et Krishna Murti [4] observent une réversion partielle, par des extraits de foie de lapin, de l'inhibition provoquée par cet antibiotique sur *Vibrio choleræ*.

Dans le foie et les reins de lapin, plus précisément dans la fraction soluble des cellules et dans les microsomes, Fouts et Brodie [39] isolent un système de nitroréductase qui réduit le chloramphénicol, l'acide para-nitrobenzoïque et d'autres composés aromatiques nitrés pour donner les amines correspondantes.

Des extraits de cerveau et de plantes contiennent un inhibiteur de la streptomycine (Rhymer et Wallace [126]), et des extraits de levure peuvent diminuer l'action de la pénicilline (Chatterway et coll. [22]).

De tous ces complexes naturels, il n'est pas toujours aisé de dégager et d'identifier le ou les facteurs responsables; le plus souvent, les expérimentateurs ont attribué aux enzymes, aux acides aminés, aux vitamines, un pouvoir d'inactivation total ou partiel.

F. — Vitamines B.

Parmi les complexes naturels dont nous venons rapidement de rappeler le pouvoir d'inhibiteurs des antibiotiques, figurent les extraits de levure, riches en vitamines du groupe B; on sait les fonctions multiples qu'exercent ces vitamines au niveau des processus biochimiques cellulaires, comme transporteurs d'hydrogène dans les systèmes enzymatiques. Il était donc logique d'en étudier l'action. Di Raimondo [27] remarque que diverses vitamines du groupe B amortissent les effets des antibiotiques : nous en reparlerons en détail plus loin. Cependant, leur rôle dans la neutralisation éventuelle des antibiotiques ne reposerait pas sur l'exaltation de certains circuits métaboliques de dérivations; en effet, selon Dony-Crotteux [29], les vitamines B agiraient par réaction photo-chimique, par photo-oxydation; la riboflavine, par exemple, serait sensibilisatrice pour inactiver les divers antibiotiques, et en particulier les tétracyclines.

Plus spécialement envers l'auréomycine, si la nicotinamide, le pantothénate de calcium, la thiamine peuvent neutraliser partiellement son action, comme nous l'avons vu à propos du mode d'action de l'auréomycine (Mondolfo H. et Mondolfo-Hounie E. [103]), ces mêmes auteurs [104] admettent que de fortes quantités de ces divers facteurs ne détruisent jamais complètement le pouvoir antibiotique. Contre la pénicilline, l'acide folique, surtout en présence de cobalamine, exercerait une protection (Alimchandani et Sreenivasan [3]).

Rappelons le rôle de la cobalamine, déjà vu à propos du glutathion, dans l'activation des groupements —SH, sensibles à la pénicilline.

Il faut ajouter qu'une modification moléculaire dans une vitamine peut amener un changement d'activité : le pantothénate de calcium, par exemple, inhibe l'action de certains antibiotiques, mais le pantothénol, au contraire, la renforce (Tritsmans et Vanbeneden [142]).

G. — Stéroïdes.

L'association médicamenteuse des stéroïdes anti-inflammatoires aux antibiotiques a amené les chercheurs à examiner *in vitro* si ces stéroïdes pouvaient modifier les conditions d'antibiose.

Les stéroïdes semblent manifester une certaine réactivité envers les antibiotiques en développant un pouvoir d'inhibition (Seneca et Bergendahl [135]). Utilisant *Pseudomonas æruginosa, Proteus vulgaris, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniæ, Shigella dysenteriæ, Salmonella typhi, Brucella bronchiseptica, Streptococcus viridans* et *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, ces auteurs constatent, avec une concentration de stéroïdes de 10 microgrammes par ml, que : l'acétate de désoxycorticostérone, la cortisone, l'hydrocortisone, le composé S (11 désoxy-17-hydroxy-corticostérone) n'ont pas d'effet inhibiteur sur les bactéries testées; ils observent que le composé S interfère avec l'action inhibitrice des antibiotiques, et que les oxystéroïdes diminuent l'action de la pénicilline et de la streptomycine, et légèrement, celle de la polymyxine et de la carbomycine; avec le groupe tétracycline, les oxystéroïdes n'interfèrent pas.

Il faut souligner qu'il peut exister une différence entre les essais en milieu solide et ceux en milieu liquide. En effet,

Popper et Lorian [119] étudiant l'action des cortisones sur le bacille de Koch, *in vitro*, concluent que cortisone et hydrocortisone, ajoutées au milieu liquide, n'ont qu'une action insignifiante, mais qu'étalées à la surface d'un milieu solide, elles augmentent la croissance du germe.

D'une façon générale, l'influence des stérols dans les milieux de culture microbiens ne peut pas être établie sur la base d'une règle commune; de nombreux paramètres entrent en jeu qui sont : la formule du stérol, la concentration stérolique dans le milieu, la nature du micro-organisme, la composition du milieu, les enzymes envisagés. A ce sujet, rappelons brièvement quelques recherches. Squire et Squire [138] avaient observé le comportement de quelques espèces envers plusieurs stéroïdes : sur 14 espèces étudiées, dont le *Streptococcus lactis*, ils avaient constaté que le bicholestéryl n'exerce aucune action; mais le chlorure et le bromure de cholestéryl inhiberaient le développement de *Klebsiella pneumoniæ* et de *Streptococcus lactis;* le cholestérol para toluène sulfonate et le 5-cholestène inhiberaient *Streptococcus lactis;* le cholestérol inhiberait *Klebsiella* (*Ærobacter*) *ærogenes*, *Shigella paradysenteriæ*, *Klebsiella pneumoniæ*, tout en stimulant, au contraire, *Alcaligenes fæcalis* et *Salmonella Schottmuelleri*. Lester et Hechter [80] étudiant l'action de la désoxycorticostérone sur des micro-organismes variés (bactéries, levures, moisissures) trouvent que ce stéroïde développe une action inhibitrice, sauf sur les bactéries à Gram négatives, qui y sont généralement insensibles. Conner et Van Wagendonk [25] notent que *Paramecium aurelia* a besoin comme facteurs de croissance de sitostérol, fucostérol, stigmastérol, alors que les stéroïdes suivants sont inactifs : diosgénine, œstrone, progestérone. Pour Hayano et Dorfman [56], la désoxycorticostérone inhibe la tyrosinase, l'uricase, l'acide ascorbique oxydase, la lipase, la transaminase, et active la glutaminase et la carboxylase de levure. Selon Matkovics [95], le cholestérol et l'ergostérol diminuent, à faible concentration, la croissance de *Penicillium chrysogenum*, tandis que les fortes concentrations stimulent sa croissance.

Ce bref rappel des influences diverses des stérols montre combien il est délicat de parler d'une neutralisation, qui ne peut s'observer que dans des cas bien particuliers, des effets antibiotiques par ces substances.

H. — Réductose.

La réductose a attiré particulièrement notre attention en raison de sa composition et de son influence dans les milieux de culture.

Potin [120] résume, ainsi, les données essentielles sur ce produit : la composition exacte de la réductose n'est pas connue; c'est un concentré de diverses réductones, obtenu par traitement, avec un alcali, de sous-produits de brasserie sucrés. Dans ce mélange, domine le diénol de l'acide tartronique, appelé habituellement réductone. On y note la présence de nombreux acides organiques, de polysaccharides, de sucre réducteurs; la réductose possède un pouvoir réducteur élevé, et n'a aucune toxicité; elle est utilisée pour supprimer l'oxygène, grand ennemi de la bière; en bactériologie, elle est employée pour la culture à l'air libre de nombreux anaérobies, selon la technique de Prévot et Moureau; indépendamment de son pouvoir réducteur, la réductose renferme, aussi, des éléments nutritifs et des activateurs de croissance; la culture des bactéries aérobies n'est pas modifiée par la présence de réductose dans les milieux, et certains caractères sont même exaltés, comme, par exemple, la pigmentation des espèces chromogènes.

Du reste, il est intéressant de noter que la réductose n'a pas toujours un effet favorable sur les cultures normales, et que son action dépend surtout de la concentration, et, aussi, du micro-organisme; c'est ainsi que Nickerson et Merkel [107] ont observé que la réductone (enediol) à la concentration de 2×10^{-4} à 2×10^{-3} M stimule la croissance de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* et n'a aucun effet sur *Escherichia coli;* mais à une plus forte concentration, la réductone inhibe *Escherichia coli.*

De Freitas, Pereira et Cardoso [26] pensent que la réductone interférerait avec la cobalamine.

Meyer, Malgras et Potin [101] étudiant, en milieu solide, par la mesure des diamètres d'inhibition, l'effet de la réductose sur la puissance des antibiotiques envers différents germes, constatent les faits suivants :

1° Si la réductose est additionnée directement, dans les cupules, à l'antibiotique : l'action de la pénicilline est diminuée, et celle de la dihydrostreptomycine n'est pas perturbée, sauf pour *Escherichia coli* qui se trouve plus lysé.

2° Si les germes sont d'abord cultivés en présence de réductose, et étalés ensuite sur des plaques de gélose, les antibiotiques se voient renforcés; le passage préalable en milieu réductosé a donc augmenté la sensibilité; cultivés à nouveau en l'absence de réductose, soumis à l'action antibiotique, les germes retrouvent leur même sensibilité initiale.

D'une façon plus générale, Potin [120] pense que la réductose, à la concentration de 1/10 en milieu liquide, augmente nettement la sensibilité aux antibiotiques.

Somme toute, la diversité d'action de la réductose lui permet, selon le micro-organisme et la concentration, d'exercer un effet favorable sur le déroulement des cultures normales ou défavorable, et, de plus, suivant le protocole expérimental, d'activer ou de réduire la puissance d'un antibiotique.

I. — Conservation des proprétés des espèces microbiennes.

Si une neutralisation totale ou partielle des effets antibiotiques à l'aide des quelques substances que nous venons de passer en revue a pu être couronnée de succès, il n'en demeure pas moins vrai que ces antibiotiques étaient toujours présents dans les milieux liquides ou solides; on pouvait, donc, se demander si les propriétés biochimiques des espèces microbiennes se trouvaient modifiés. Jusqu'à présent, on utilisait des procédés indirects, dont voici un aperçu :

Hinglais et Langlade [59] se servent d'une souche microbienne en provenance d'une série de cultures contenant un antibiotique, et expérimentent, dans le tube à dose antibiotique sub-létale, le changement éventuel d'activité biochimique; les auteurs ont, ainsi, constaté que le pouvoir pathogène d'un staphylocoque peut disparaître, avant que ne soit bloquée la capacité de prolifération du germe. Richou, Kourilsky et Chirol [127] mettent en contact, pendant des temps variables, des souches avec des quantités plus ou moins importantes d'antibiotiques; puis, les réensemencent en milieu sans antibiotique, et examinent, dans le filtrat, quelques propriétés : ainsi, ni la pénicilline ni la streptomycine ne détruiraient les propriétés toxigènes et gélatinolytiques des staphylocoques.

De son côté, Brisou [15] a testé *in vitro* le pouvoir de quelques enzymes en présence d'antibiotiques.

Mais, les travaux relatifs à la conservation des propriétés

dans les milieux où un métabolite a rétabli un circuit métabolique coupé par un antibiotique sont très rares, puisque nous n'avons noté que les recherches de Faguet [35] sur les courbes de croissance : comparée aux courbes de croissance de souche témoin et de souche introduite en milieu pénicilliné additionné de pénicillinase, la courbe de croissance de la souche mise en milieu pénicilliné additionné de nucléinate de sodium montre un retard de multiplication dû à l'allongement de la phase de latence qui dure environ six heures.

Dans le cas que nous envisageons ici, il faut bien remarquer qu'il s'agit de la conservation des propriétés dans un milieu où l'antibiotique se trouve à dose franchement létale et dont l'action a été annulée, non par une neutralisation découlant d'une combinaison avec l'antibiotique, mais par adjonction d'un composé de suppléance pour la bactérie, composé de suppléance qui, peut-être, n'a pas mis la bactérie à l'abri de toutes les manifestations possibles de l'antibiotique.

II. — TRANSFORMATION D'UNE SOUCHE SENSIBLE EN SOUCHE RÉSISTANTE EN L'ABSENCE DE L'ANTIBIOTIQUE, ET ROLE DES VITAMINES.

Peu de temps après les premières utilisations cliniques de la pénicilline, le premier des antibiotiques, on avait remarqué que la sensibilité, chez certaines espèces microbiennes, s'affaissait : le microbe s'était adapté à la pénicilline, était devenu résistant, et il fallait augmenter les doses de pénicilline.

In vitro, les chercheurs s'aperçurent dès 1941 que des repiquages en bouillon pénicilliné, pendant seize semaines, permettaient à un staphylocoque d'augmenter de 1 000 fois sa résistance à la pénicilline ! D'innombrables observations similaires, portant sur divers antibiotiques, ont été publiées depuis. Ce qui caractérise cette résistance acquise est son mode d'obtention, par adaptation progressive à l'antibiotique ou par mutation; mais ce n'est pas le seul procédé possible, car, au moyen d'artifices appropriés, une souche sensible peut effectivement être rendue résistante en l'absence de l'antibiotique. Nous allons examiner ces différentes méthodes.

Par une méthode dite des « replica plating » Lederberg et Lederberg [79] avaient réussi à obtenir des mutants résistants; ces mutants ne seraient pas totalement résistants et

ne produisent pas de pénicillinase, selon Banic [5], qui a, aussi, constaté qu'ils libéreraient des substances capables, après combinaison avec la pénicilline, de précipiter par le formol dans la gélose à la périphérie des colonies. Plus biochimiques, ont été les travaux de Hotchkiss [61, 62] : cet auteur a réalisé des transformations induites de souches de pneumocoques sensibles à la pénicilline, en souches résistantes en les faisant croître en présence d'extraits de pneumocoques résistants, dont l'agent inducteur serait un acide désoxyribonucléique ou une désoxyribonucléoprotéine. Alexander et Leidy [2] opèrent de même pour la streptomycine.

De toute autre façon, Gale et Rodwell [44] ont entraîné une souche de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* à croître en l'absence de tout amino-acide à l'exception d'histidine et de cystine, et, après entraînement, cette souche s'est révélée cinq cents fois plus résistante à la pénicilline que la souche mère; cette souche a donc été habituée à se passer d'amino-acides préformés pour sa croissance. Dans le même ordre d'idées, English et McCoy [34] ont réalisé une souche hautement résistante à la streptomycine par passages d'une souche de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* sensible, sur milieux déficients en biotine; la souche devenait, par conséquent, capable de ne plus avoir besoin de biotine. Mais il ne faudrait pas conclure que la corrélation entre l'antibio-résistance et le pouvoir général de synthèse soit constante; ainsi, certaines souches de *Bacillus subtilis* sont très sensibles à la pénicilline, bien qu'elles puissent se développer en milieu contenant seulement des sels d'ammonium comme source d'azote (Hunter et Baker [64], Grelet [46]).

La pauvreté relative d'un milieu de culture n'est pas le seul moyen capable d'augmenter la résistance d'une souche aux antibiotiques; un excès en vitamines, par exemple, peut être favorable.

Di Raimondo [27] constate que des staphylocoques, vivant en milieux enrichis en amide nicotinique, acide folique, pyridoxol, ou acide para-amino-benzoïque, deviendraient plus résistants envers les antibiotiques; l'application pratique de ces observations se traduit ainsi (Di Raimondo et coll. [28]) : des souris reçoivent une injection de vitamines du complexe B trois heures avant une injection intrapéritonéale de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* (0,5 ml d'une suspension à 1 p. 10.000) et de pénicilline (500 U.I.); sans pénicilline, la

mortalité fut de 52 % ; avec pénicilline seule, 0 % ; avec pénicilline et pyridoxol, amide nicotinique, acide folique ou cobalamine, la mortalité fut de 37,5 % à 55 % ; d'autres vitamines du complexe B n'avaient qu'une action nulle ou insignifiante ; ainsi donc, pyridoxol, amide nicotinique, acide folique et cobalamine rendraient le staphylocoque plus résistant *in vivo* à la pénicilline.

D'autre part, il faut noter que des expositions de *Escherichia coli* à l'acide para-amino-benzoïque n'ont pas permis d'augmenter sa résistance aux sulfamides (Strauss et coll. [139]), ce qui démontre qu'une parenté chimique structurale n'est pas suffisante pour expliquer les phénomènes de résistance. Relativement à la teneur en vitamines du groupe B des organismes résistants, on est frappé de constater que l'induction de la résistance aux antibiotiques n'apporte pas de variations remarquables à la propriété de synthèse des vitamines, d'après Princivalle M. et Von Lorch L. [124] ; ces auteurs ont étudié le pouvoir de synthèse de quelques souches bactériennes : *Lactobacillus acidophilus, Streptococcus lactis, Bacillus subtilis, Lactobacillus bifidus,* rendues résistantes par adaptation graduelle aux antibiotiques les plus utilisés ; ce pouvoir de synthèse portait sur quelques vitamines du groupe B : thiamine, riboflavine, pyridoxol, cobalamine, nicotinamide, acide pantothénique, acide folique ; par comparaison avec des souches d'origine, le pouvoir de synthèse de ces vitamines n'accusait pas de grandes différences.

Toutefois, d'autres chercheurs (Wyss et Schaiberger [156]) ainsi que Mika et coll. [102], avaient observé une plus grande quantité d'acide pantothénique chez des souches résistantes à la streptomycine.

Signalons, aussi, que divers savants constatent que la synthèse des vitamines est moindre chez les souches résistantes que chez les souches non résistantes, et qu'il s'agirait là d'un des mécanismes de la résistance (Mannino et Pipitone [90]) ; ces mêmes auteurs [91] remarquent qu'une quantité moindre de cobalamine et d'acide folique est synthétisée par *Escherichia coli,* en présence de doses subinhibitrices d'auréomycine, de pénicilline, de streptomycine, de chloramphénicol ou de terramycine. Peterson et Johansson [118] trouvent davantage de cobalamine dans une souche de *Escherichia coli* sensible à la chlortétracycline que dans une souche résistante : pour la souche sensible, l'absorption de cobalamine serait plus importante.

Quelle que soit la relation entre la teneur en vitamines du groupe B des micro-organismes résistants et leur rôle dans les phénomènes de résistance, il faut bien constater que de nombreux chercheurs ont consacré leurs travaux à ce problème.

La base des procédés que nous venons d'examiner repose essentiellement sur des modifications apportées à la composition des milieux de culture habituels; et, il est évident que l'acquisition par le micro-organisme, de nouvelles propriétés, relève d'un changement d'ordre métabolique; cette constatation pourrait paraître superflue, et, pourtant, à ce sujet même une question préalable se pose; par exemple, un métabolite ou une vitamine ajouté à un milieu ou retiré de ce milieu exalte-t-il un système enzymatique ou, au contraire, l'annule-t-il ? Il s'agirait de l'effet inverse de l'adaptation enzymatique, par inhibition spécifique de la synthèse constitutive; cette théorie a été exposée par Monod [105], qui résume ses recherches en collaboration avec Cohn M., Cohen G. N. et Cohen-Bazire G.; en voici quelques illustrations : la méthionine en concentrations relativement fortes, inhibe chez *Escherichia coli,* la formation du système qui synthétise la méthionine; de même, le tryptophane, pour la synthèse de l'enzyme d'utilisation du tryptophane; chez certains mutants de *Escherichia coli,* le lactose inhibe la synthèse constitutive de la galactosidase.

Ces faits démontrent amplement la sensibilité des systèmes enzymatiques vis-à-vis d'inducteurs et d'inhibiteurs.

Il est difficile de réunir par des liens communs l'ensemble des travaux relatifs à la neutralisation des effets des antibiotiques par ces inhibiteurs : leurs variétés et leurs diversités peuvent décevoir; mais, les points d'action des antibiotiques, eux aussi, sont multiples.

Revoir ces questions, tenter de nouvelles méthodes, essayer de dégager quelques explications plausibles des faits expérimentaux, tels sont les buts de nos recherches; nous les avons pratiquées à l'aide d'espèces lactiques, dont nous avons souligné, dans notre introduction, toute l'importance.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE PREMIER

SOUCHES UTILISÉES ET MILIEUX DE CULTURE

Pour effectuer nos diverses recherches, nous nous sommes procuré les souches suivantes auprès de collections nationales et internationales. De cette façon, nous sommes certain de n'avoir utilisé que des cultures vraiment typiques.

1° En provenance de l'Institut Pasteur de Paris (Service de M. SANCHEZ) :

Lactobacillus bulgaricus B.B.Y.,
Streptococcus lactis E III.

2° En provenance de la Station Régionale de Recherches Laitières de Poligny (Jura), dont la direction du service est assurée par M. MOCQUOT :

Lactobacillus helveticus E 4,
Streptococcus lactis R 7 an.

3° En provenance de « The National Collection of Dairy Organisms », Shinfield, par Reading, Berks, Angleterre.

Streptococcus lactis XI 3 n° 496,
Streptococcus lactis n° 497,
Streptococcus lactis n° 866,
Streptococcus cremoris n° 893,
Streptococcus cremoris n° 918.

Les indications portées sont les références des micro-organismes dans les collections. Les souches de Shinfield sont

productrices d'antibiotique. Les souches de Paris et de Poligny nous sont parvenues en milieu lacté; celles de Shinfield se trouvaient à l'état lyophilisé; elles ont été remises en milieu lacté, et ont retrouvé leur vitalité normale au bout de trois à quatre repiquages. Toutes les souches ont été entretenues par repiquages sur lait tournesolé stérilisé; et, avant d'être employées, elles subissaient un passage préalable dans le milieu de culture électif approprié choisi.

Les ensemencements sont pratiqués à l'aide de pipettes Pasteur, à raison d'une quinzaine de gouttes par tube de 10 ml de milieu, par prélèvement dans une culture précédente de dix-huit à vingt-quatre heures.

La numération exacte des bactéries introduites lors des réensemencements ne nous a pas paru utile; car les substances antibiotiques ne sont pas très sensibles aux variations de concentrations microbiennes, par opposition aux antiseptiques chimiques (Lambin et Robert [76]). Dans les cas où une comparaison rigoureuse des développements s'imposait, nous avons utilisé la pipette compte-gouttes de Duclaux.

Les formes lactobacilles sont cultivées à 45° C, et les formes streptocoques à 30° C.

On peut dire que le terrain naturel de culture des ferments lactiques est constitué par le lait ou d'autres produits naturels; les milieux usuels du bactériologiste, notamment le bouillon de viande peptoné, conviennent mal (Manil [89]).

Pour des études d'antibiose, il est toujours préférable d'employer des milieux limpides, afin de mieux apprécier le moindre trouble éventuel, qui est la signature d'un développement microbien.

Nous avons employé le bouillon glucosé tamponné pour la culture des streptocoques et des pneumocoques, délivré par l'Institut Pasteur (1) et le bouillon carotte-foie (2) selon la formule de Negri et Von Lorch [106].

---

(1) Le bouillon glucosé tamponné de l'Institut Pasteur a la composition suivante :

Extrait de viande Liébig	5 g
Peptone spéciale	10 g
Chlorure de sodium	2,50 g
Phosphate monopotassique	0,70 g
Phosphate disodique	8,30 g
Glucose R. A. L.	2 g
Eau	1 000 ml

(2) Le bouillon carotte-foie de Negri et von Lorch se prépare ainsi : faire bouillir 1 kg de carottes dans 2 litres d'eau de fontaine; filtrer;

Le *p*H de chacun de ces milieux a été vérifié à l'aide d'une gamme colorimétrique liquide contrôlée par un appareil de mesure électrique Meci. Nous avons trouvé les valeurs suivantes :

*p*H 6 pour le milieu carotte-foie.

*p*H 7,6 pour le milieu glucosé tamponné.

Il nous a paru nécessaire de comparer l'efficacité pratique de chacun de ces milieux. La différence de valeur de *p*H de ces milieux, pour la culture de germes qui peuvent être étroitement exigeants de ce point de vue, montre qu'il n'est pas indifférent d'utiliser l'un ou l'autre.

Pour juger de l'intensité de développement des espèces lactiques que nous utiliserons couramment dans nos essais, nous procédons de la manière ci-après :

X gouttes de culture, comptées à la pipette compte-gouttes de Duclaux, en provenance d'un repiquage de dix heures sur milieu carotte-foie, sont introduites dans 10 ml de chaque milieu expérimenté; après dix-huit heures d'incubation, l'intensité néphélométrique du développement est évaluée en degrés Vernes à l'aide du photomètre de Vernes, Bricq et Constant; un témoin de chaque milieu, non ensemencé, sert de point zéro.

TABLEAU I

ETUDE COMPARATIVE DE L'INTENSITÉ NÉPHÉLOMÉTRIQUE DE DÉVELOPPEMENT DANS LES DEUX DIFFÉRENTS MILIEUX, SELON LES ESPÈCES UTILISÉES.

MILIEU DE CULTURE	*Lactobacillus bulgaricus* B. B. Y.	*Lactobacillus helveticus* E 4	*Streptococcus lactis* E III	*Streptococcus lactis* R 7 an
Milieu carotte-foie	422	425	424	380
Milieu glucosé tamponné	39	28	395	83

compléter à 2 litres et ajouter 20 g de peptone et 10 g de chlorure de sodium; ensuite, faire bouillir 1 kg de foie de bœuf dans 2 litres d'eau de fontaine; filtrer; compléter à 2 litres et ajouter 20 g de peptone et 10 g de chlorure de sodium; réunir ces deux décoctés à parties égales et porter à *p*H 6. Stériliser par tyndallisation.

Il ressort de ce tableau que le milieu carotte-foie se montre favorable pour chacune des quatre espèces; seul le *Streptococcus lactis* E III se contente parfaitement du simple milieu glucosé tamponné.

En conclusion de ces travaux préliminaires, nous nous trouvons, donc, dans l'obligation, afin d'obtenir des résultats comparables, d'employer le milieu carotte-foie quand nous nous servirons de l'ensemble de ces quatre espèces. Le milieu glucosé tamponné sera réservé au *Streptococcus lactis* E III, lorsque cette espèce sera seule en expérience.

Tous nos essais seront, de toutes façons, toujours pratiqués en milieu liquide.

CHAPITRE II

INHIBITEURS DES ANTIBIOTIQUES

Dans ce chapitre, nous traiterons des métabolites inhibiteurs ajoutés aux milieux de culture, qui contiennent l'antibiotique, en reprenant, dans l'ordre, ceux déjà énumérés au cours de l'exposé bibliographique, mais, aussi, en adaptant et en modifiant les conditions expérimentales.

I. — MESURES DE SENSIBILITÉ DES SOUCHES

Nous avons procédé à des mesures de sensibilité aux antibiotiques des souches employées, en milieu carotte-foie.

Nous avons retenu des doses franchement inhibitrices, c'est-à-dire qu'elles empêchent tout développement en soixante-douze heures, au moins. Dans la suite de notre travail, l'expression « dose létale » des souches correspondra à ces concentrations.

Les doses sont toujours rapportées à 1 ml.

La pénicilline est exprimée en unités internationales (nous employons la pénicilline G).

La streptomycine, le chloramphénicol et l'auréomycine sont exprimés en microgrammes.

Comme on le voit, il ne s'agit pas là de nombres exprimant la sensibilité limite, mais de concentrations suffisamment inhibitrices, pour nous permettre d'apprécier la valeur d'un métabolite effecteur en vingt-quatre à quarante-huit heures; pour la commodité des manipulations, nous avons uniformisé certaines doses d'inhibition; ce qui nous importe, en effet,

c'est de réaliser, d'abord, les conditions d'une antibiose. Dans tous nos essais, des témoins avec et sans antibiotique sont toujours disposés.

TABLEAU II

Doses létales minima, rapportées au ml, de la pénicilline, de la streptomycine, du chloramphénicol et de l'auréomycine, pour chacune des espèces lactiques utilisées.

Antibiotiques	*Lactobacillus bulgaricus* B. B. Y.	*Lactobacillus helveticus* E 4	*Streptococcus lactis* E III	*Streptococcus lactis* R 7 an
Pénicilline.....	0,10 U. I.	0,70 U. I.	0,50 U. I.	0,10 U. I.
Streptomycine	30 µg	30 µg	60 µg	30 µg
Chloramphén..	7,5 µg	7,5 µg	7,5 µg	7,5 µg
Auréomycine...	2,5 µg	2,5 µg	2,5 µg	2,5 µg

II. — MÉTABOLITES INHIBITEURS AJOUTÉS AU MILIEU DE CULTURE ET ESSAIS AVEC LES VITAMINES

A. — Ribonucléinate de sodium

Comme inhibiteur de la pénicilline et de la streptomycine, nous avons employé le ribonucléinate de sodium, très soluble dans l'eau. Les tubes contenant la pénicilline sont lus après vingt-quatre heures d'incubation, et ceux contenant la streptomycine après vingt-quatre et quarante-huit heures.

Dans les tubes qui renferment la pénicilline, les concentrations au cours de nos essais ont été régulièrement et respectivement en ribonucléinate de sodium de :

1/500, 1/1.000, 1/50.000 et 1/100.000,

et dans ceux qui contiennent la streptomycine, elles sont de :

1/500 et 1/50.000.

Lactobacillus bulgaricus B.B.Y., *Lactobacillus helveticus* E 4, *Streptococcus lactis* E III et *Streptococcus lactis* R 7 an ont été les quatre souches employées, en milieu carotte-foie.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

— 0,10 à 0,70 unité de pénicilline par ml sont neutralisées par une concentration de ribonucléinate de sodium dans le milieu, de 1/500 et 1/1.000, mais ne le sont pas par une concentration de 1/50.000 ou de 1/100.000, ceci pour chacune des quatre souches.

— 30 à 60 µg de streptomycine par ml sont neutralisés par une concentration de ribonucléinate de sodium dans le milieu de 1/500, dans les vingt-quatre heures, sauf pour le *Streptococcus lactis* E III, pour lequel il faut attendre quarante-huit heures; pour une concentration de 1/50.000, il est nécessaire d'attendre quarante-huit heures, sauf pour le *Streptococcus lactis* E III qui ne se développe pas; il faut noter que, pour ce streptocoque, il a été employé des doses de streptomycine doubles de celles utilisées pour les autres espèces; en quarante-huit heures, également, il n'y a pas de développement du *Streptococcus lactis* R 7 an, pour une concentration de 1/50.000. Dans un but de comparaison, nous avons fait varier le milieu de culture, pour *Streptococcus lactis* E III, en utilisant le milieu glucosé tamponné; nous avons obtenu les mêmes résultats que ceux précédemment décrits, aussi bien pour la pénicilline que pour la streptomycine. Le principe de l'action antipénicilline et antistreptomycine du ribonucléinate de sodium a donc bien été vérifié.

B. — Cystéine.

Nous avons préparé une solution tampon au phosphate d'après Sörensen :

Phosphate disodique M/15	10 ml
Phosphate monopotassique M/15	90 ml

donnant un *p*H : 5,91.

D'une part, dans 10 ml de cette solution tampon, nous avons introduit :

1° Pénicilline (sel de sodium)	0,1 mg
1 (—) cystéine	5 mg

Cette solution n° 1 est abandonnée à l'étuve à 25° C pendant une heure.

D'autre part, dans 10 autres ml de la solution tampon, nous avons introduit :

2° Streptomycine	2.000 µg
1 (—) cystéine	50 mg

Cette solution n° 2 est laissée à l'étuve à 25° C pendant quinze minutes.

Sachant que 1 mg de pénicillinate de sodium titre 1.667 unités internationales, 0,10 ml de la solution n° 1 renferme 0,001 mg de pénicilline, titrant ainsi 1,66 unité. Quant à la solution n° 2, 1 ml renferme 200 µg de streptomycine.

Nous avons, alors, disposé des tubes contenant le milieu carotte-foie, dans lesquels nous avons placé, pour chaque espèce étudiée, des quantités d'antibiotiques qui ont été en contact avec la l (—) cystéine, semblables à celles provoquant l'inhibition certaine de ces espèces, telles que nous les avons déjà établies.

Aucune reprise de la culture n'a été observée dans ces tubes; par conséquent, le contact préalable de la pénicilline et de la streptomycine avec la l (—) cystéine, suivant le protocole expérimental décrit, n'a pas supprimé l'action antibiotique.

Puisque ces essais pratiqués avec le mélange incubé cystéine-pénicilline et avec le mélange incubé cystéine-streptomycine n'ont pas montré l'inhibition escomptée, nous nous sommes demandé si l'introduction directe de cystéine dans les milieux respectivement additionnés de pénicilline et de streptomycine pouvait rétablir le développement. Les résultats ont été négatifs, et, de plus, introduite seule dans le milieu, la cystéine est inhibitrice à la dose de 0,01 g par ml.

Pourtant, la cystéine a bien la qualité généralement reconnue sur d'autres espèces que les ferments lactiques, d'inhibiteur de la pénicilline et de la streptomycine; nous avons supposé que l'échec de son action que nous avons enregistré était imputable à sa concentration même dans le milieu : une dose de 0,01 g/ml, nous venons de le dire, arrête le développement microbien normal.

C'est pourquoi, nous avons repris cette expérience d'introduction directe de la cystéine dans le milieu de culture, mais en réduisant la quantité introduite; nous avons bien, alors, constaté l'action inhibitrice de la cystéine aux doses suivantes : à la concentration de 0,005 g/ml, la cystéine annule

l'effet de la pénicilline à 0,70 U.I./ml, et de la streptomycine à 60 µg/ml.

C. — Glutathion et cobalamine.

Lactobacillus bulgaricus B.B.Y. a été mis en présence d'une part de pénicilline, d'autre part de streptomycine, dans des tubes de milieu carotte-foie que nous avions additionnés : les uns de 0,001 g de glutathion par ml, les autres du mélange de 0,001 g de glutathion et de 20 µg de cobalamine par ml.

Aucun rétablissement de la croissance n'a été constaté.

D. — Sérum sanguin.

Nous avons employé le sérum sanguin filtré délivré par l'Institut Pasteur, à la concentration de 0,20 ml par ml de milieu; aux doses antibiotiques létales habituelles, il n'y a pas de reprise de culture; aux doses sub-létales, la reprise du développement s'intensifie. Les essais, en milieu carotte-foie, ont été effectués à l'aide de *Lactobacillus bulgaricus* B.B.Y. et de *Streptococcus lactis* E III.

E. — Complexes naturels.

Nous avons préparé une macération (solutés à 10 p. 100 de la poudre, et réduction au 1/5) de poudre de cervelle et d'hydrolysat de caséine; après stérilisation, nous avons ajouté cette macération au milieu carotte-foie dans la proportion de 1/10; avec la pénicilline et la streptomycine les quatre espèces lactiques n'ont pu se développer.

Spécialement en vue de la neutralisation de l'effet du chloramphénicol, nous avons préparé un extrait de foie de lapin [1].

Cette solution est répartie dans les tubes de culture dans la proportion de 50 p. 100, avec le milieu carotte-foie.

Avec *Lactobacillus helveticus* E 4, en présence de chloramphénicol, on enregistre une nette action favorisante anti-inhibitrice de l'extrait de foie de lapin; cependant, cet extrait

(1) Trois foies de lapin sont découpés en petits fragments et mis à macérer dans 200 ml d'eau distillée; cette macération de quarante-huit heures, en glacière, est grossièrement passée au tamis, puis soumise à une rapide ébullition, filtrée et stérilisée par tyndallisation. On dispose alors d'une solution limpide de *p*H 5.

n'annule pas systématiquement le chloramphénicol, mais permet une reprise de la culture dans quelques tubes.

Toujours en vue de neutraliser l'action du chloramphénicol, nous avons préparé et utilisé un concentré d'hydrolysat de caséine et un concentré de peptone pancréatique; ajoutés aux milieux de culture, dans la même proportion que l'extrait de foie de lapin, ces concentrés, obtenus par réduction des solutés (solutés à 10 p. 100 de la poudre et réduction au 1/5) n'ont pas d'influence dans les milieux, même si on y ajoute de la cocarboxylase, à la dose de 0,005 g par ml.

F. — Vitamines B.

En milieu carotte-foie, a été ajouté le complexe de vitamines B suivant, par ml :

Riboflavine	0,0002 g
Pantothénol	0,0003 g
Thiamine	0,0005 g
Pyridoxol	0,0002 g
Nicotinamide	0,0020 g

Une série de tubes de ce milieu vitaminé a reçu la pénicilline, une autre série la streptomycine et chaque série a été ensemencée de *Lactobacillus bulgaricus* B.B.Y.; aucun développement n'a été observé.

D'autres essais ont été pratiqués avec *Streptococcus lactis* E III à l'aide d'un autre complexe de vitamines du groupe B, et en présence de l'antibiotique.

La composition de ce complexe a été la suivante, par ml de milieu :

Riboflavine	0,0001 g
Thiamine	0,0005 g
Pyridoxol	0,0005 g
Nicotinamide	0,0005 g
Méso-inositol	0,0005 g
Biotine	0,0005 g
Pantothénate de calcium	0,0005 g
Acide folique	0,0005 g
Cobalamine	10 µg

Ni l'action de la pénicilline, ni celle de la streptomycine n'ont été annulées par ce complexe.

Particulièrement envers l'auréomycine, nous avons essayé l'action de la biotine, de la thiamine et de l'amide nicotinique, introduites ensemble dans le milieu, aux concentrations de 0,002 g par ml pour chacune de ces vitamines.

Que ce soit avec *Lactobacillus bulgaricus* B.B.Y. ou avec *Streptococcus lactis* E III, le développement est nul.

G. — Stéroïdes.

Pour une concentration en désoxycorticostérone de 0,0001 g par millilitre et de 0,001 g/ml il n'a été observé aucune reprise de culture du *Lactobacillus helveticus* E 4 en présence de pénicilline à raison de 0,70 unité internationale/ml; de plus, pour une dose de pénicilline dégressive, de 0,60 unité internationale/ml à 0,20/ml, il ne s'est manifesté, au contact de la désoxycorticostérone, aucun développement, alors que ces mêmes doses de pénicilline, introduites seules dans le milieu, ne sont pas toxiques pour le bacille.

Il faut donc en conclure que la désoxycorticostérone manifeste une certaine action de renforcement de l'effet antibiotique. Mais à quel stade ? Le stéroïde intervient-il au niveau de l'antibiose proprement dite, ou au niveau de la simple croissance microbienne ? Pour résoudre cette question, nous avons mené de front des cultures, dans les mêmes conditions, les unes sans désoxycorticostérone, les autres avec désoxycorticostérone, et nous avons évalué l'intensité de chacun des développements. La concentration de désoxycorticostérone est de 0,005 g/ml; à cette concentration, une partie du stéroïde précipite, et se dépose au fond de la cuve; le but que nous désirions était d'essayer de réaliser une saturation maximum en stéroïde.

En milieu carotte-foie, après quinze heures de culture en provenance d'un repiquage de vingt-quatre heures, nous avons déterminé la densité optique, à l'aide du photomètre de Vernes, Bricq et Constant, de chacun de ces développements réalisés exactement suivant le même protocole : réensemencements de X gouttes comptées à la pipette compte-gouttes de Duclaux, en 10 ml de milieu.

Le tableau ci-après résume nos résultats (voir p. 48).

Il apparaît, donc, clairement que la désoxycorticostérone ralentit par elle-même la croissance microbienne, ce qui explique, par conséquent, le phénomène apparent de « renforcement » de l'action antibiotique que nous avions constaté

TABLEAU III

INTENSITÉ NÉPHÉLOMÉTRIQUE DU DÉVELOPPEMENT DES ESPÈCES LACTIQUES UTILISÉES DANS LE MILIEU DE CULTURE CONTENANT ET NE CONTENANT PAS DE LA DÉSOXYCORTICOSTÉRONE, A RAISON DE 0,005 G PAR ML.

ESPÈCE ÉTUDIÉE	AVEC DÉSOXY-CORTICOSTÉRONE	SANS DÉSOXY-CORTICOSTÉRONE
Lactobacillus bulgaricus B. B. Y.	54	418
Lactobacillus helveticus E 4 ...	187	422
Streptococcus lactis E III	203	354
Streptococcus lactis R 7 an	242	416

avec *Lactobacillus helveticus* E 4; ce stéroïde ne saurait donc neutraliser les effets d'un antibiotique.

H. — RÉDUCTOSE.

Le comportement de nos espèces lactiques a été étudié :

1° En présence de réductose seule;

2° De réductose et d'antibiotique;

3° De réductose, d'antibiotique et de ribonucléinate de sodium.

La suspension de réductose utilisée est une suspension aqueuse à 25 p. 1.000, délivrée par l'Institut Pasteur. *Lactobacillus bulgaricus* B.B.Y. a été l'espèce type choisie, tout d'abord. Le ribonucléinate de sodium neutralise, nous l'avons vu, l'action de la pénicilline et de la streptomycine, mais n'agit pas vis-à-vis du chloramphénicol et de l'auréomycine; nous avons, quand même, tenté l'expérience avec ces deux derniers antibiotiques. En milieu carotte-foie, les doses antibiotiques sont les doses inhibitrices habituelles.

Il ressort de nos expériences que la réductose, à la concentration de 0,020 ml par ml, empêche l'action du ribonucléinate de sodium; à la dose de 0,002 g par ml le ribonucléinate de sodium seul neutralise l'effet de la pénicilline ou de la streptomycine; si l'on lui associe la réductose, il ne peut alors rétablir la croissance microbienne.

Envers le chloramphénicol ou l'auréomycine, cette action de la réductose n'a pu être observée, car l'effet de ces deux antibiotiques n'est pas modifié par le ribonucléinate de sodium, comme nous l'avons constaté.

Reprenant nos essais avec la pénicilline et la streptomycine, nous avons remarqué que pour *Streptococcus lactis* E III, en milieu glucosé tamponné, les résultats sont plus nets avec 0,10 ml de réductose par ml.

Il faut noter, cependant, que dans quelques séries expérimentales, une reprise de culture, en milieu réductosé avec ribonucléinate, était favorisée par un séjour à l'étuve plus prolongé, uniquement dans les tubes contenant la streptomycine, et non dans ceux contenant la pénicilline.

Par elle-même, sans antibiotique, la réductose ne modifie nullement le développement microbien. Nous avons examiné au photomètre la densité optique des milieux ensemencés, avec et sans réductose, après vingt-quatre heures de culture; dans chacun des tubes, l'ensemencement avait eu lieu à l'aide de X gouttes comptées à la pipette compte-gouttes de Duclaux, qui provenaient d'une culture précédente de dix-huit heures, de *Streptococcus lactis* E III, en milieu glucosé tamponné.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus :

TABLEAU IV

Etude comparative de l'intensité néphélométrique de développement avec et sans réductose.

Milieu glucosé tamponné	Densité optique
Milieu seul	343
Milieu + 0,02 ml réductose/ml	343
Milieu + 0,10 ml réductose/ml	353

On peut, donc, supposer que l'action de la réductose, que nous avons constatée, se manifeste en milieux contenant l'antibiotique, autrement qu'en modifiant les conditions de croissance microbienne.

Nous avons pensé à une formation possible de complexe entre réductose et ribonucléinate, l'effet de ce dernier se trouvant ainsi annulé. Pour élucider cette question, nous avons

adapté à notre travail une recherche de WOLFF et BRIGNON [154]. Ces auteurs ont étudié, à l'aide de diverses bactéries, et en milieux variés, le sulfate de protamine comme substance antibactérienne; ce sulfate de protamine se trouve neutralisé par addition aux milieux d'acide ribonucléique, en raison de la formation d'une combinaison protamine-acide nucléique. Avec *Streptococcus lactis* E III en milieu glucosé tamponné, nous avons disposé trois séries de tubes :

— Une série reçoit le sulfate de protamine à doses croissantes : 25 µg par ml dans le premier tube, 50 µg par ml dans le deuxième tube;

— Une autre série reçoit les mêmes doses de sulfate de protamine dans le milieu contenant 200 µg de ribonucléinate de sodium par ml;

— Une dernière série reçoit les mêmes doses de sulfate de protamine avec 200 µg de ribonucléinate de sodium par ml et aussi avec 0,05 ml de suspension de réductose par ml.

Cette disposition nous permettra de voir si la réductose s'est complexée avec le ribonucléinate, empêchant alors l'action antiprotamine de ce dernier.

Le tableau ci-dessous montre que l'action du ribonucléinate n'est nullement entravée par la présence de réductose, ce qui permet de conclure que l'action empêchante de la réductose en milieu, par exemple, pénicilliné avec ribonucléinate, ne se situe pas au niveau d'un complexe réductose-ribonucléinate. En effet, le ribonucléinate est resté libre et a pu venir, comme si la réductose n'avait pas été ajoutée, neutraliser l'action antimicrobienne de la protamine.

TABLEAU V

ESSAIS AVEC LE RIBONUCLÉINATE DE SODIUM, LA RÉDUCTOSE ET LE SULFATE DE PROTAMINE.

SULFATE DE PROTAMINE	25 µg/ml	50 µg/ml
Milieu glucosé tamponné seul	0	0
Milieu + 200 µg ribonucléinate/ml..	+ +	+ +
Milieu + 200 µg ribonucléinate/ml.. + 0,05 ml réductose/ml.....	+ +	+ +

Suivant le même protocole établi lors des essais avec la réductose, en milieux renfermant l'antibiotique et le ribonucléinate de sodium, nous avons recherché si d'autres substances réductrices pouvaient agir de la même façon.

Les substances réductrices essayées sont l'acide ascorbique et l'acide succinique; ces deux acides, dans toutes nos expériences, ont exactement le même comportement, qui est celui-ci :

— En culture normale simple : le développement se ralentit à partir d'une concentration, en acide, de 0,005 g/ml, pour s'annuler à 0,01 g/ml, où l'action létale de ces corps est très nette.

— En milieu contenant l'antibiotique et le nucléinate de sodium : le développement reprend jusqu'à une concentration en acide de 0,005 g/ml.

En d'autres termes, tant que la concentration en acide ascorbique ou en acide succinique ne trouble pas le déroulement normal de la culture, l'action de ces acides ne se fait pas sentir dans le rétablissement d'une culture contenant de la pénicilline ou de la streptomycine, et du nucléinate de sodium.

On peut se demander, enfin, si l'action inhibitrice de la réductose sur le nucléinate de sodium comme neutralisant de la pénicilline, ne serait pas due à une modification du potentiel d'oxydo-réduction du milieu, qui sortirait des limites utilisables par les enzymes microbiens qui font la synthèse des nucléo-protides.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à des mesures de Eh et des *p*H, avec le potentiomètre Meci, après avoir vérifié le bon fonctionnement de l'appareil avec des mélanges d'ions ferreux-ions ferriques où nous avons retrouvé le potentiel normal du fer. La précaution a été prise de tout effectuer en atmosphère d'azote désoxygéné. Nos résultats sont consignés dans le tableau ci-après (voir p. 52).

On y remarque que l'abaissement de rH_2 produit par l'addition de réductose est de même ordre de grandeur que celui provoqué par l'acide ascorbique et l'acide succinique. La culture même du *S. lactis*, à elle seule, abaisse encore davantage le rH_2 du milieu, ce qui correspond bien au pouvoir réducteur important de ce germe, mis en évidence habituellement en microbiologie, par la réduction de la teinture de tournesol ajoutée à du lait stérilisé. Or, après vingt-quatre heures de

TABLEAU VI

Effet de diverses substances sur le potentiel d'oxydo-réduction du milieu.

Milieu	Substance ajoutée	*p*H	Eh (en millivolts)
Milieu glucosé tamponné de l'Institut Pasteur	Néant	8	235
	0,05 ml de sol. de réductose par ml.	7,9	215
	0,1 ml de réductose par ml	7,9	180
	0,2 ml de réductose par ml	7,9	105
	0,1 mg d'acide succinique par ml...	7,6	230
	1 mg — — — ...	7,2	230
	2,5 mg — — — ...	6,7	215
	5 mg — — — ...	5,6	210
	10 mg — — — ...	5,2	205
	20 mg — — — ...	4,7	205
	0,1 mg d'acide ascorbique par ml...	7,8	235
	1 mg — — — ...	7,5	195
	2,5 mg — — — ...	7,5	195
	5 mg — — — ...	7	185
	10 mg — — — ...	5,5	175
	20 mg — — — ...	4,7	170
	Néant et milieu ensemencé avec *S. lactis* E III, au bout de 24 h. de culture	7	160

multiplication, même à rH_2 bas, le streptocoque montre toujours sa sensibilité à la pénicilline, et la possibilité de rétablissement de la croissance par addition de ribonucléinate de sodium.

De plus, des trois corps étudiés comme modificateurs du potentiel d'oxydo-réduction, seule la réductose a eu une remarquable activité antiribonucléinate. Celle-ci lui est donc propre et paraît totalement indépendante de l'abaissement du rH_2 lui-même.

III. — COMPORTEMENT DES PRINCIPAUX INHIBITEURS D'ANTIBIOTIQUES VIS-A-VIS DE QUELQUES ANTIBIOTIQUES MINEURS.

Il nous a paru nécessaire et utile de tester l'action des composés, examinés précédemment du point de vue de leur inhibition des antibiotiques majeurs, envers : la terramycine, la néomycine, la tyrothricine et la bacitracine.

Utilisant *Streptococcus lactis* E III en milieu glucosé tamponné, nous avons déterminé les doses des antibiotiques précités qui l'inhibent; le tableau ci-dessous indique les concentrations inhibitrices :

TABLEAU VII

Antibiotiques	Concentration inhibitrice par ml
Terramycine	1,25 µg
Néomycine	3,75 µg
Tyrothricine.....	50 µg
Bacitracine	1 U.

Puis, nous reportant aux techniques employées pour les antibiotiques majeurs, nous avons essayé de supprimer l'antibiose avec le ribonucléinate de sodium, le sérum sanguin, le glutathion et la cobalamine, les complexes naturels (hydrolysat de caséine et poudre de cervelle), le complexe de vitamines B, et la cystéine.

Les résultats obtenus montrent que, seule, la néomycine a été neutralisée par l'action du ribonucléinate de sodium, et par la cystéine; pour une concentration en ribonucléinate de 0,002 g par ml, la néomycine s'est trouvée dépourvue d'activité aux doses de 3,75 µg à 22,50 µg par ml, au moins; et 0,005 g par ml de cystéine neutralise l'action d'au moins 11,25 µg par ml de néomycine. Le tableau VIII résume ces essais.

TABLEAU VIII

ACTION COMPARÉE DE DIVERS INHIBITEURS D'ANTIBIOTIQUES ENVERS LA TERRAMYCINE, LA NÉOMYCINE, LA TYROTHRICINE ET LA BACITRACINE.

ANTIBIOTIQUES	RIBONUCLÉINATE DE SODIUM 0,002 g/ml	SÉRUM SANGUIN 0,20/ml	GLUTATHION 0,001 g/ml COBALAMINE 20 µg/ml	COMPLEXES NATURELS ET VITAMINES B (*cf.* chap. II)	CYSTÉINE 0,005 g/ml
Terramycine.	0	0	0	0	0
Néomycine...	+	0	0	0	+
Tyrothricine	0	0	0	0	0
Bacitracine...	0	0	0	0	0

Seuls, le ribonucléinate de sodium et la cystéine ont inhibé l'action de la néomycine, les autres produits se sont montrés inefficaces; aucune inhibition n'a été observée pour la terramycine, la tyrothricine et la bacitracine.

IV. — CONSERVATION DES PROPRIÉTÉS MICROBIENNES LORSQUE L'ANTIBIOSE EST SUPPRIMÉE

Nous avons vu que le ribonucléinate de sodium, ajouté à un milieu contenant de la pénicilline, permettait le développement bactérien; le ribonucléinate remplace l'acide ribonucléique dont la formation est bloquée par l'antibiotique. Si le développement bactérien est effectivement rétabli, on peut, toutefois, se demander dans quelles conditions la bactérie retrouve son activité normale en présence de l'antibiotique encore existant dans le milieu. Il nous a paru intéressant de rechercher si la bactérie assure la persistance de ses caractères biochimiques habituels, par comparaison avec son activité en terrain normal.

Dans ce but, nous utiliserons la souche *Streptococcus lactis* E III, la pénicilline à la dose de 0,6 unité par ml, le ribo-

TABLEAU IX

A L'AIDE DE *Streptococcus lactis* E III, EXAMEN DE QUELQUES CARACTÈRES BIOCHIMIQUES EN CULTURE NORMALE ET EN CULTURE CONTENANT DE LA PÉNICILLINE ET DU NUCLÉINATE DE SOUDE.

MILIEU	ACTION ÉTUDIÉE	DISPOSITION EXPÉRIMENTALE	VALEUR
Carotte-foie	*p*H	Milieu initial	6,6
		Milieu ensemencé sans pénicilline	4,5
		Milieu avec pénicilline	6
		Milieu ensemencé avec pénicilline et ribonucléinate	6
Clark et Lübs	*p*H	Milieu initial	6,8
		Milieu ensemencé sans pénicilline	5,4
		Milieu avec pénicilline	6,6
		Milieu ensemencé avec pénicilline et ribonucléinate	6,2
Clark et Lübs	Réaction de Voges-Proskauer : production d'acétylméthylcarbinol.	Milieu ensemencé sans pénicilline	+++
		Milieu ensemencé avec pénicilline	0
		Milieu ensemencé avec pénicilline et ribonucléinate	+
Lait	Coagulation	Milieu ensemencé sans pénicilline	En 8 à 10 heures
		Milieu ensemencé avec pénicilline et ribonucléinate	En 15 à 20 heures
Carotte-foie	Formation d'ammoniaque à partir du chlorhydrate d'arginine 0,005 g/ml.	Milieu ensemencé sans pénicilline	Brunissement de papier imbibé de réactif de Nessler +++
		Milieu ensemencé avec pénicilline et ribonucléinate	Brunissement de papier imbibé de réactif de Nessler +

nucléinate de sodium à la concentration de 0,002 g par ml. Des tubes témoins contenant de la pénicilline sans ribonucléinate et d'autres ne contenant pas de pénicilline sont également disposés. Nous limiterons ces recherches à l'action sur le *p*H, la réaction de Voges-Proskauer, la coagulation du lait, la réaction de l'arginine.

L'ensemble de ces réactions, résumé dans le tableau IX, montre que la pénicilline, encore présente dans le milieu, ne gêne pas le déroulement des quelques actions étudiées, une fois le développement rétabli par la présence de ribonucléinate de sodium; il faut noter, seulement, une diminution générale et certaine de l'intensité des activités envisagées.

V. — DISCUSSION DU CHAPITRE II

Dans cette partie de notre travail, nous avons pu établir que les seuls métabolites ajoutés aux milieux de culture qui avaient permis l'inhibition de l'action de la pénicilline et de la streptomycine sont le ribonucléinate de sodium et la cystéine. L'effet de ces métabolites est, donc, aussi favorable pour les ferments lactiques que pour les espèces pathogènes (exemple : *Micrococcus pyogenes*, var. *aureus*). Le ribonucléinate de sodium, par sa présence dans le milieu, pallie le blocage de l'acide ribonucléique déterminé par la pénicilline, chez la cellule bactérienne; en vingt-quatre heures, le résultat est démonstratif, quel que soit le milieu de culture utilisé; dans le cas de la streptomycine il y a inactivation, par le ribonucléinate, du type acide-base, comme pour toutes les substances de poids moléculaire élevé et à point isoélectrique acide (von Euler et Heller [149]); mais, dans ce cas de la streptomycine, il est nécessaire d'attendre quarante-huit heures pour avoir une vue complète de l'action du ribonucléinate, quel que soit le milieu employé : bouillon carotte-foie ou bouillon glucosé tamponné. Nous sommes amené à observer un temps de latence plus grand que pour la pénicilline : faudrait-il admettre que la molécule de streptomycine, par ses deux fractions (streptidine, streptobiosamine) d'activité physico-chimique différente, réagirait différemment envers, d'une part, le ribonucléinate, d'autre part, les constituants bactériens; un tel schéma d'activité avait été pressenti par Rybak et coll. [129].

En ce qui concerne la cystéine, nous n'avons pas noté d'inhibition de l'antibiotique, si la cystéine est combinée par avance à la pénicilline ou à la streptomycine, selon la technique de Cavalitto [19]; mais, introduite directement dans le milieu, en concentration appropriée, la cystéine annule l'action de ces deux antibiotiques; il est donc possible que l'explication de cette diversité d'action rejoigne la constatation de Cavalitto également [20], selon laquelle, plus la concentration en pénicilline est basse (en dessous de 10 unités par ml), plus grande doit être la concentration en cystéine et plus long aussi le temps d'inactivation, tandis qu'une importante concentration antibiotique est rapidement détruite par la cystéine. Mais aussi, comme nous l'avons vu, un excès de cystéine entrave le déroulement normal de la culture.

Par son comportement, la réductose occupe une place particulière parmi les effecteurs. Alors qu'ajoutée aux milieux de culture normaux, elle augmente l'intensité du développement bactérien, elle le ralentit, au contraire, lorsque ces milieux sont additionnés d'antibiotiques, en renforçant l'action de ces derniers. La réductose abaisse le rH_2 des milieux, d'où son usage dans les techniques d'anaérobiose à l'air libre. Or, du point de vue oxydo-réducteur, un antibiotique tel que la pénicilline élève le rH_2 (Drouhet et Kepes [30, 31], Dufrénoy et Pratt [33]), alors que normalement, pendant la phase de croissance logarithmique, il y a un abaissement; d'autre part, l'adjonction de ribonucléinate de sodium à un milieu pénicilliné détermine, par rapport à une culture normale, un allongement du temps de latence de six heures à huit heures (Faguet [35]); on devrait, donc, obtenir, par la présence de réductose, une diminution de ce temps de latence avec une reprise plus rapide de la culture, puisqu'en abaissant le rH_2 on supprimerait l'élévation de rH_2 due à la pénicilline, ce qui favoriserait la phase de croissance logarithmique; or, nous avons constaté le contraire : peut-être faut-il supposer que la présence de réductose, en milieu pénicilliné ou streptomyciné, désorganiserait les systèmes oxydo-réducteurs avec d'autant plus de facilité que le temps de latence demandé par le ribonucléinate pour la reprise de la culture se trouve allongé, aussi bien dans le cas de la pénicilline, selon Faguet, que dans le cas de la streptomycine, comme nous l'avons dit plus haut.

L'étude d'autres substances réductrices telles que l'acide

ascorbique et l'acide succinique ne nous a pas aidé à éclaircir l'action de la réductose; il serait, par conséquent, utile, croyons-nous, de revoir cette question en essayant l'action de composés tels que la triose-réductone et l'acide aminobenzoïque réductone. Nous n'avons pu réaliser ce travail jusqu'à présent, car il ne nous a pas été possible de nous procurer ces produits.

Il faut noter, enfin, que les autres inhibiteurs d'antibiotiques que nous avons étudiés ne nous ont pas donné de résultats favorables, alors que leur efficacité a été observée par d'autres chercheurs, mais sur des germes différents des ferments lactiques. Il faut remarquer, en outre, que tous nos essais ont eu lieu en milieux liquides, tandis que les expérimentateurs travaillaient surtout en milieux solides, et comptaient le nombre des colonies qui, grâce à ces inhibiteurs, avaient pu se développer. Le but de cette méthode était d'éviter, par mesure de sécurité, tout développement microbien, à partir d'un mutant éventuel, qui ne serait pas en liaison directe avec la levée d'inhibition; le trouble des milieux de culture, déterminé par la croissance de ce mutant, fausserait par conséquent le résultat; en ce qui concerne nos essais en milieu liquide, nous n'avons pas observé ce phénomène; mais nos recherches montrent surtout l'intérêt qu'il y avait à revoir l'ensemble de cette question.

VI. — CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Les essais d'inhibition d'antibiotiques, agissant sur les ferments lactiques, à l'aide de divers métabolites, en milieu liquide, peuvent se résumer ainsi :

1° *Le ribonucléinate de sodium,* en concentration appropriée, peut neutraliser l'effet de la pénicilline et de la streptomycine.

2° *La cystéine :* après mélange préalable de cystéine avec l'antibiotique, il n'y a pas d'inhibition de la pénicilline, ni de la streptomycine; introduite directement dans le milieu, la cystéine est active en fonction de sa concentration.

3° *Le glutathion et la cobalamine,* isolés ou associés, n'ont pas empêché l'action de la pénicilline ni de la streptomycine.

4° *Le sérum sanguin* ne manifeste qu'une légère action

favorable à des doses sub-inhibitrices de pénicilline et de streptomycine.

5° *Certains complexes naturels,* poudre de cervelle, hydrolysat de caséine, peptone pancréatique, foie de lapin, ajoutés aux milieux en solution concentrée, ne sont guère efficaces pour supprimer les actions de la pénicilline, de la streptomycine et du chloramphénicol.

6° *Les vitamines B :* le groupe de vitamines B testé, en associations variées, n'a pas supprimé l'action de la pénicilline, de la streptomycine, ni de l'auréomycine.

7° *Parmi les stéroïdes,* la désoxycorticostérone n'annule pas l'action de la pénicilline, et ralentit la croissance des espèces étudiées.

8° *La réductose* ne supprime l'action d'aucun antibiotique, mais empêche l'action neutralisante du ribonucléinate de sodium vis-à-vis de la pénicilline et parfois aussi vis-à-vis de la streptomycine.

9° En ce qui concerne les antibiotiques autres que les quatre antibiotiques majeurs désignés plus haut, seuls le ribonucléinate de sodium et la cystéine ont pu inhiber l'action de la néomycine; tous les autres inhibiteurs essayés se sont avérés inefficaces. Quant à la terramycine, tyrothricine, bacitracine, aucun inhibiteur ne nous est apparu efficace.

10° Enfin, en ce qui concerne la conservation des propriétés biochimiques des espèces lactiques, quand l'antibiose due à la pénicilline est réellement supprimée par le ribonucléinate de sodium, le micro-organisme reprend son développement sans altération totale de quelques propriétés d'identification : seule est observée une diminution de leur intensité.

CHAPITRE III

RECHERCHES D'UNE OPPOSITION AUX ANTIBIOTIQUES EN RAISON D'UN CARACTÈRE BIOLOGIQUE PARTICULIER DES SOUCHES

Nous nous proposons d'étudier dans ce chapitre le comportement des souches qui présentent certains caractères physiologiques particuliers en relation avec leur potentiel métabolique.

Tout d'abord, nous examinerons des souches lactiques productrices d'antibiotiques; en raison de leur aptitude d'élaboration de substances antibiotiques, ces souches nous paraissent occuper une position vraiment spéciale; on peut, en effet, se demander si leur équipement cellulaire leur permet une parade efficace contre d'autres antibiotiques que ceux qu'elles produisent.

Ensuite, nous reprendrons une souche non productrice d'antibiotique et nous essayerons, par entraînement spécial, de créer par avance des circuits métaboliques de suppléance capables de s'opposer aux actions antibiotiques.

I. — EXAMEN DE SOUCHES PRODUCTRICES D'ANTIBIOTIQUES

Certaines souches (de *Streptococcus lactis*, essentiellement) produisent de la nisine (Mattick et Hirsch [96], Berridge [12], Mc Lintock et coll. [98]) et d'autres (de *Streptococcus*

cremoris) de la diplococcine (Whitehead [151], Oxford [111, 110]).

Les souches produisant de la nisine expérimentées par nous sont les suivantes :

Streptococcus lactis XI 3 n° 496,
Streptococcus lactis n° 497,
Streptococcus lactis n° 866,

et celles produisant de la diplococcine :

Streptococcus cremoris n° 893,
Streptococcus cremoris n° 918.

Chacune de ces souches est soumise à l'action des quatre antibiotiques principaux (pénicilline, streptomycine, chloramphénicol, auréomycine) en proportions croissantes, dans le milieu carotte-foie. Les tubes contenant la pénicilline sont lus au bout de vingt-quatre heures, et les tubes contenant les autres antibiotiques après un séjour de vingt-quatre et de quarante-huit heures.

De cette étude concernant le comportement d'espèces lactiques productrices d'antibiotiques envers les quatre antibiotiques majeurs, nous pouvons conclure que ces espèces réagissent différemment les unes des autres, et qu'elles sont, ainsi, plus ou moins vulnérables. Notons les cas de résistance relative de *Streptococcus lactis* XI 3 n° 496 à au moins 2 unités de pénicilline par ml, et de *Streptococcus cremoris* n° 893 à 100 µg de streptomycine par ml. Parmi les germes pathogènes, des résistances égales ou supérieures ne sont pas rares, mais chez les germes lactiques, la sensibilité est, en général, assez forte, et en tout cas, beaucoup plus habituellement que ne le montrent ces souches antibiogènes. Cette résistance très partielle et assez générale, aux substances antimicrobiennes les plus habituelles de la thérapeutique, est très intéressante à noter, car on sait que, par ailleurs, les souches nisinogènes de *Streptococcus lactis* sont tout à fait sensibles à la diplococcine, tandis que les variétés diplococcinogènes de *Streptococcus cremoris* sont bel et bien inhibées par la nisine.

TABLEAU X

Sensibilité, aux quatre antibiotiques majeurs, de souches lactiques productrices d'antibiotiques.

Antibiotiques	Concentration antibiotique	*Streptococcus lactis* XI 3 n° 496	*Streptococcus lactis* n° 497
Pénicilline	0,20 U.	+	0
	0,40 U.	+	0
	0,60 U.	+	0
	0,80 U.	+	0
	1,00 U.	+	0
	1,20 U.	+	0
	2,00 U.	+	0
	3,00 U.	0	0
Streptomycine	20 µg	+,+	0,0
	40 µg	0,±	0,0
	60 µg	0,0	0,0
	80 µg	0,0	0,0
	100 µg	0,0	0,0
	150 µg	0,0	0,0
	200 µg	0,0	0,0
Chloramphénicol	5 µg	0,0	0,0
	10 µg	0,0	0,0
	20 µg	0,0	0,0
Auréomycine	2,50 µg	0,±	0,0
	5 µg	0,0	0,0
	7,50 µg	0,0	0,0

TABLEAU X *(suite)*

SENSIBILITÉ, AUX QUATRE ANTIBIOTIQUES MAJEURS, DE SOUCHES LACTIQUES PRODUCTRICES D'ANTIBIOTIQUES.

ANTIBIOTIQUES	CONCENTRATION ANTIBIOTIQUE	*Strepto. lactis* n° 866	*Strepto. cremoris* n° 893	*Strepto. cremoris* n° 918
Pénicilline	0,20 U.	++	0	0
	0,40 U.	0	0	0
	0,60 U.	0	0	0
	0,80 U.	0	0	0
	1,00 U.	0	0	0
	1,20 U.	0	0	0
	2,00 U.	0	0	0
	3,00 U.	0	0	0
Streptomycine	20 µg	++,++	++,++	±,+
	40 µg	++,++	++,++	0,+
	60 µg	0,0	++,++	0,0
	80 µg	0,0	++,++	0,0
	100 µg	0,0	++,++	0,0
	150 µg	0,0	0,0	0,0
	200 µg	0,0	0,0	0,0
Chloramphénicol	5 µg	0,+	0,0	0,0
	10 µg	0,0	0,0	0,0
	20 µg	0,0	0,0	0,0
Auréomycine	2,50 µg	0,0	±,+	0,0
	5 µg	0,0	0,±	0,0
	7,50 µg	0,0	0,0	0,0

II. — ESSAIS D'ENTRAINEMENT AVEC LES VITAMINES DU GROUPE B

Nous avons pensé renforcer et réactiver, en l'absence de l'antibiotique, certains métabolismes bactériens dont l'utilisation, en quelque sorte en dérivation, pourrait assurer la survivance de la bactérie une fois celle-ci mise en contact, ensuite, avec l'antibiotique. Quels activateurs utiliser ? La première idée qui vient à l'esprit est d'essayer des complexes vitaminiques B, dont on sait l'importance au niveau des coenzymes, dans des aires d'action variées.

A. — Utilisation de vitamines du groupe B.

1° *Vitamines B 1, PP, B 12.*

Nous nous sommes servi de *Streptococcus lactis* E III et du milieu glucosé tamponné; le micro-organisme a subi dix repiquages successifs biquotidiens (soit deux fois par jour) dans ce milieu que nous avions additionné de vitamines B 1, PP, B 12 à la dose suivante, par ml :

Thiamine	0,0005 g
Nicotinamide	0,001 g
Cobalamine	10 µg

La souche entraînée à se reproduire sur ce milieu vitaminé, par repiquages successifs, est alors soumise à l'action de la pénicilline, de la streptomycine, du chloramphénicol, et de l'auréomycine, à concentrations croissantes; et la même souche d'origine, non entraînée, est, également, testée dans les mêmes conditions, sur le milieu vitaminé de même composition.

Des essais de contrôle ont été pratiqués et ont confirmé nos résultats; nous avons, en effet, repris la souche d'origine à laquelle nous avons fait subir dix repiquages biquotidiens, en milieu vitaminé de même composition, et nous avons obtenu un variant présentant à la pénicilline et à la streptomycine une résistance du même ordre que celle obtenue la première fois.

Le problème qui se pose maintenant est de savoir quel mélange de vitamines ou quelle vitamine est responsable de cette résistance.

TABLEAU XI

SENSIBILITÉ DE LA SOUCHE AVANT ET APRÈS DIX REPIQUAGES EN MILIEU CONTENANT LA THIAMINE, L'AMIDE NICOTINIQUE ET LA COBALAMINE.

ANTIBIOTIQUES	CONCENTRATION ANTIBIOTIQUE	SOUCHE D'ORIGINE	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR THIAMINE, AMIDE NICOTINIQUE ET COBALAMINE
Pénicilline	0,50 U.	++	++
	0,70 U.	+	+
	0,90 U.	0	±
	1,10 U.	0	+
	1,50 U.	0	+
	1,80 U.	0	++
Streptomycine ...	60 µg	0	++
	80 µg	0	++
	120 µg	0	++
	180 µg	0	++
Chloramphénicol.	7,5 µg	0	0
Auréomycine	2,5 µg	0	0
	5 µg	0	0

Nous avons, alors, entraîné la souche d'origine suivant le même processus que celui préalablement décrit, mais, cette fois, dans les milieux suivants :

— D'une part dans le milieu contenant, par ml :

Thiamine ..... 0,0005 g
Nicotinamide ..... 0,001 g

— D'autre part dans le milieu contenant par ml :

Cobalamine ..... 10 µg.

Dans chaque cas, le milieu de base étant toujours le milieu glucosé tamponné, et les repiquages au nombre de dix, biquotidiens.

Le tableau suivant montre que seule la cobalamine a permis l'obtention de la résistance.

TABLEAU XII

SENSIBILITÉ DE LA SOUCHE APRÈS DIX REPIQUAGES EN MILIEU CONTENANT LA THIAMINE ET L'AMIDE NICOTINIQUE D'UNE PART, ET EN MILIEU CONTENANT LA COBALAMINE, D'AUTRE PART.

ANTIBIOTIQUES	CONCENTRATION ANTIBIOTIQUE	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR THIAMINE ET AMIDE NICOTINIQUE	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR COBALAMINE
Pénicilline	0,80 U.	0	++
	1,00 U.	0	++
	1,50 U.	0	++
	1,80 U.	0	++
	2,00 U.	0	++
	2,50 U.	0	0
Streptomycine ..	60 µg	0	++
	80 µg	0	++
	120 µg	0	++
	180 µg	0	++
	200 µg	0	++
	250 µg	0	±

La résistance ainsi acquise est de [1] :

2 unités de pénicilline par ml, soit près de trois fois la résistance naturelle, et de

250 µg de streptomycine par ml, soit plus de quatre fois la résistance naturelle.

On peut se demander si des passages plus prolongés en milieu enrichi en cobalamine permettent d'obtenir une plus grande résistance; c'est pourquoi, nous avons fait subir au

(1) Le calcul d'augmentation de la résistance a été effectué à partir d'une valeur maximum de la résistance naturelle observée dans les multiples témoins chaque fois établis.

Streptococcus lactis E III 30 repiquages biquotidiens sur le milieu glucosé tamponné additionné de 10 µg de cobalamine par ml.

Après cette série de repiquages, la souche est, alors, dans un milieu de même composition, mise en présence de quantités croissantes de pénicilline, d'une part, et de streptomycine, d'autre part.

Par ce moyen, nous avons réussi à obtenir une résistance : à la pénicilline, de 6 unités par ml, soit près de 9 fois la résistance naturelle, et à la streptomycine, de 1.500 µg par ml, soit plus de 25 fois la résistance naturelle.

La répétition des passages en milieu vitaminé B 12 a donc provoqué, très nettement, une importante augmentation de la résistance. Que se passerait-il si on faisait subir des passages en ce milieu vitaminé B 12 à une souche déjà résistante à la pénicilline, par exemple, par le procédé de l'adaptation progressive ?

Nous avons, dans ce but, adapté le *Streptococcus lactis* E III, souche d'origine, à la pénicilline par passages en milieu glucosé tamponné contenant des doses croissantes de pénicilline, cela par repiquages successifs; la résistance obtenue atteignait 9 unités par ml. Le variant a été remis en culture dans le milieu vitaminé B 12 à 10 µg par ml, et après dix repiquages biquotidiens, nous l'avons mis en présence de doses croissantes de pénicilline; les résultats ne font apparaître aucune augmentation de la résistance qui reste limitée à 9 unités par ml; il n'y a donc pas addition des deux types de résistance.

2° *Riboflavine, pyridoxol et pantothénate de calcium.*

Cette fois, le *Streptococcus lactis* E III a été cultivé sur milieu glucosé tamponné enrichi en vitamines B 2, B 6 et pantothénate de calcium, à raison, par ml, de :

Riboflavine	5 µg
Pyridoxol	0,0025 g
Pantothénate de calcium	0,0025 g

Après dix repiquages successifs biquotidiens dans ce milieu, la souche entraînée a été mise en présence des antibiotiques à doses croissantes dans le milieu vitaminé de même composition, et, à titre comparatif, la souche d'origine a été testée dans des milieux contenant les mêmes vitamines et les mêmes antibiotiques.

TABLEAU XIII

SENSIBILITÉ DE LA SOUCHE AVANT ET APRÈS DIX REPIQUAGES EN MILIEU CONTENANT LA RIBOFLAVINE, LE PYRIDOXOL ET LE PANTOTHÉNATE DE CALCIUM.

ANTIBIOTIQUES	CONCENTRATION ANTIBIOTIQUE	SOUCHE D'ORIGINE	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR RIBOFLAVINE, PYRIDOXOL ET PANTOTHÉNATE DE CALCIUM
Pénicilline	0,50 U.	0	0
	0,70 U.	0	0
	0,80 U.	0	0
	1,00 U.	0	0
	1,50 U.	0	0
Streptomycine ..	60 µg	0	0
	80 µg	0	0
	120 µg	0	0
	180 µg	0	0
Chloramphénicol.	7,5 µg	0	0
Auréomycine	2,5 µg	0	0
	5 µg	0	0

La riboflavine, le pyridoxol et le pantothénate de calcium n'ont donné lieu dans le micro-organisme à l'établissement d'aucun facteur de résistance envers les antibiotiques : pénicilline, streptomycine, chloramphénicol et auréomycine.

3° *Autres vitamines hydrosolubles du groupe B : méso-inositol, acide folique, biotine.*

Le *Streptococcus lactis* E III est cultivé sur milieu glucosé tamponné, que nous avons additionné de méso-inositol, acide folique, biotine, dans les proportions suivantes, par ml :

Méso-inositol ..... 0,001 g
Acide folique ..... 200 µg
Biotine ..... 200 µg

Comme précédemment, le streptocoque a subi 10 repiquages successifs biquotidiens dans ce milieu sur-vitaminé; ensuite, la souche entraînée a été mise en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques; de même, la souche d'origine remise en culture dans ce même milieu a été, d'autre part, soumise aux mêmes concentrations antibiotiques.

TABLEAU XIV

SENSIBILITÉ DE LA SOUCHE AVANT ET APRÈS DIX REPIQUAGES EN MILIEU CONTENANT LE MÉSO-INOSITOL, L'ACIDE FOLIQUE ET LA BIOTINE.

ANTIBIOTIQUES	CONCENTRATION ANTIBIOTIQUE	SOUCHE D'ORIGINE	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR MÉSO-INOSITOL, ACIDE FOLIQUE ET BIOTINE
Pénicilline	0,50 U.	0	++
	0,70 U.	0	++
	0,80 U.	0	++
	1,00 U.	0	++
	1,50 U.	0	++
Streptomycine ..	60 µg	0	+
	80 µg	0	+
	120 µg	0	+
	180 µg	0	0
Chloramphénicol.	7,5 µg	0	0
Auréomycine	2,5 µg	0	0
	5 µg	0	0

Une résistance a donc été acquise envers la pénicilline et la streptomycine par passages de la souche sur milieux renfermant les trois vitamines : méso-inositol, acide folique et biotine.

Il est donc nécessaire de déterminer si un de ces trois composés peut être rendu seul responsable de la résistance.

Nous avons entraîné la souche d'origine, d'une part dans le milieu contenant, par ml :

Acide folique ..... 200 µg

et d'autre part dans le milieu contenant, par ml :

Méso-inositol ..... 0,001 g
Biotine ..... 200 µg

les repiquages, au nombre de 10, sont biquotidiens.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus, et montre que l'acide folique n'a pas déterminé de résistance chez le streptocoque.

TABLEAU XV

SENSIBILITÉ DE LA SOUCHE APRÈS DIX REPIQUAGES EN MILIEU CONTENANT L'ACIDE FOLIQUE, D'UNE PART, ET EN MILIEU CONTENANT LE MÉSO-INOSITOL ET LA BIOTINE, D'AUTRE PART.

ANTIBIOTIQUES	CONCENTRATION ANTIBIOTIQUE	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR ACIDE FOLIQUE	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR MÉSO-INOSITOL ET BIOTINE
Pénicilline	0,50 U.	0	++
	0,70 U.	0	++
	0,80 U.	0	++
	1,00 U.	0	++
	1,50 U.	0	++
	2,00 U.	0	++
Streptomycine ..	60 µg	0	++
	80 µg	0	++
	120 µg	0	++
	180 µg	0	++
	200 µg	0	++

La surcharge interne microbienne provoquant la résistance est-elle due au méso-inositol ou à la biotine, ou, aussi, à l'association de ces deux composés ?

Nous allons reprendre séparément chacun de ces deux

corps, pour y entraîner la souche d'origine, par 10 repiquages; l'entraînement a donc lieu dans le milieu contenant d'une part, par ml :

Méso-inositol ..... 0,001 g

et d'autre part dans le milieu contenant par ml :

Biotine ..... 200 µg

La lecture du tableau ci-dessous montre que :

La biotine a déterminé un état de résistance envers la pénicilline dans de notables concentrations, tandis que le méso-inositol a développé, aussi, l'apparition d'une résistance mais moins intense; la biotine a déterminé, de son côté, un état de résistance envers la streptomycine, tandis que le méso-inositol n'a eu qu'un rôle plus modeste.

TABLEAU XVI

SENSIBILITÉ DE LA SOUCHE APRÈS DIX REPIQUAGES EN MILIEU CONTENANT LA BIOTINE, D'UNE PART, ET EN MILIEU CONTENANT LE MÉSO-INOSITOL, D'AUTRE PART.

ANTIBIOTIQUES	CONCENTRATION ANTIBIOTIQUE	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR BIOTINE	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR MÉSO-INOSITOL
Pénicilline	0,50 U.	++	++
	0,70 U.	++	+
	0,80 U.	++	+
	1,00 U.	++	+
	1,50 U.	++	+
	2,00 U.	++	+
Streptomycine ..	60 µg	++	++
	80 µg	++	++
	120 µg	++	0
	180 µg	++	0
	200 µg	++	0

Pour la biotine, la résistance acquise est de :

2 unités de pénicilline par ml, soit près de 3 fois la résistance naturelle, et de 200 µg de streptomycine par ml, environ 4 fois la résistance naturelle.

Pour le méso-inositol, la résistance acquise est de :

2 unités de pénicilline par ml, soit près de 3 fois la résistance naturelle, et de 80 µg de streptomycine par ml, soit moins de 2 fois la résistance naturelle.

Nous avons poursuivi l'entraînement sur milieu contenant de la biotine et sur milieu contenant du méso-inositol, et après un total de 30 repiquages biquotidiens, nous avons obtenu respectivement les résistances suivantes :

Pour la biotine :

10 unités de pénicilline par ml, soit plus de 14 fois la résistance naturelle, et de 250 µg de streptomycine par ml, soit plus de 4 fois la résistance naturelle.

Pour le méso-inositol :

10 unités de pénicilline par ml, soit plus de 14 fois la résistance naturelle, et de 500 µg de streptomycine par ml, soit environ 8 fois la résistance naturelle.

B. — Etude des courbes de croissance de la souche d'origine et des variants.

Nous avons établi la courbe de croissance de *Streptococcus lactis* E III souche d'origine et de ses différents variants obtenus par passage sur milieux vitaminés; à titre de comparaison nous avons, également, établi la courbe de croissance d'un variant de ce même streptocoque ayant été rendu résistant à la pénicilline, par adaptation progressive, jusqu'à 9 unités par ml de milieu, maximum que nous n'avons pas réussi à dépasser.

L'état de résistance d'une souche se répercute sur sa courbe de croissance; c'est ainsi que, selon Machebœuf et Gros [85], les staphylocoques pénicillino-résistants présenteraient un rythme de divisions exponentielles beaucoup plus lent que les souches sensibles, mais, cependant, les résultats de Caspersson [18] et de Malmgren et Heden [87] établissent qu'il y aurait, au contraire, chez les résistants, une division plus active; une scission plus intense est, aussi, observée chez les bactéries issues d'un milieu sulfamidé (Kayser et Pouteau-Thouvenot [72]).

L'expérience nous a montré que les nombres les plus significatifs, traduisant la densité opacimétrique, et relevés à l'aide du photomètre Vernes, Bricq et Constant, se situaient dans les six premières heures de la croissance.

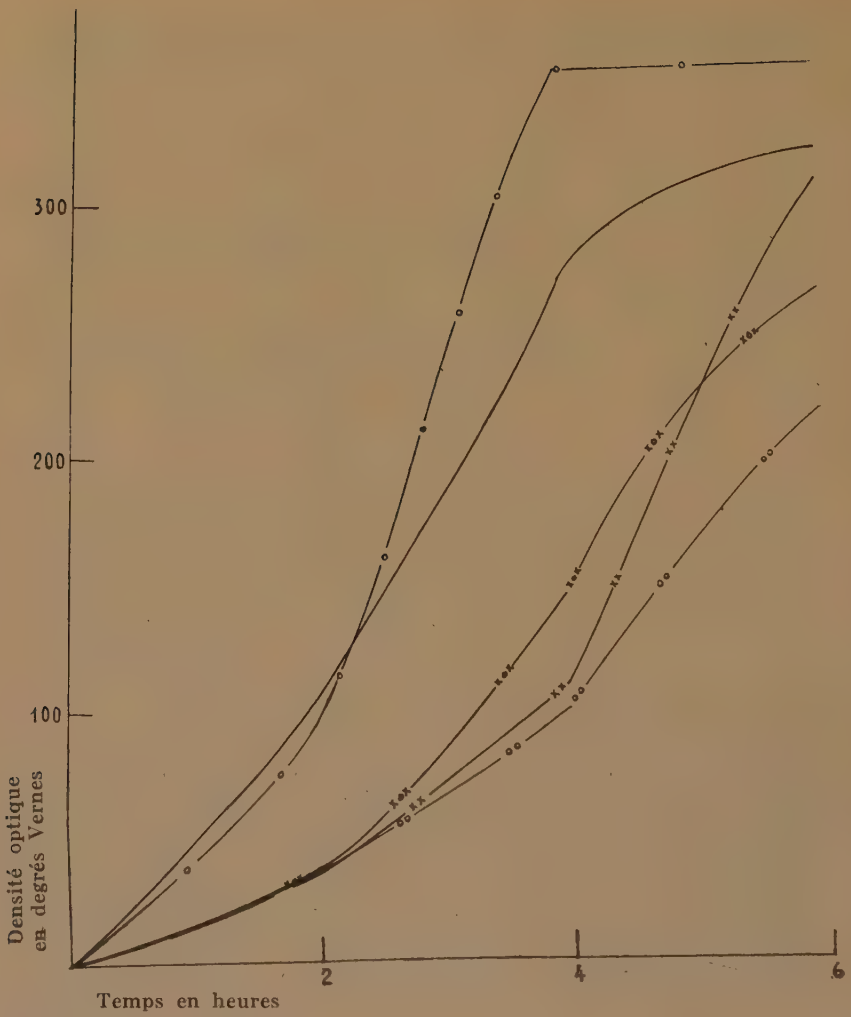
Nous avons, alors, ensemencé 10 ml de milieu glucosé tamponné vitaminé correspondant, de V gouttes de culture comptées à la pipette compte-gouttes de Duclaux, en provenance d'un repiquage de quinze heures; ce repiquage provient, lui-même, du dixième tube de la culture entraînée sur le milieu vitaminé étudié.

La densité opacimétrique est notée après une culture de deux heures, de quatre heures et de six heures; la courbe de chaque culture est représentée sur le graphique.

Graphique 1.

Souche d'origine et variants obtenus après dix repiquages sur les milieux vitaminés ayant déterminé une résistance. Intensité néphélométrique du développement.

Souche et ses variants	en 2 h.	en 4 h.	en 6 h.	Identification des courbes
Souche d'origine	102	267	315	——————
Variant provenant du milieu cobalamine ...	93	348	348	——o——o——
Variant provenant du milieu biotine	35	108	303	——xx——xx——
Variant provenant du milieu méso-inositol..	37	143	261	——xox——xox——
Variant provenant de l'adaptation à la pénicilline	36	98	214	——oo——oo——



Graphique 1.

Souche de *Streptococcus lactis* E III d'origine, et variants obtenus après dix repiquages sur les milieux vitaminés ayant déterminé une résistance. Intensité néphélométrique du développement. (Le variant provenant de l'adaptation à la pénicilline a été indiqué à titre de comparaison.)

———— : souche d'origine.
——o——o—— : variant provenant du milieu à la cobalamine.
——xx——xx—— : variant provenant du milieu biotine.
——xox——xox—— : variant provenant du milieu méso-inositol.
——oo——oo—— : variant provenant de l'adaptation à la pénicilline.

Graphique 2.

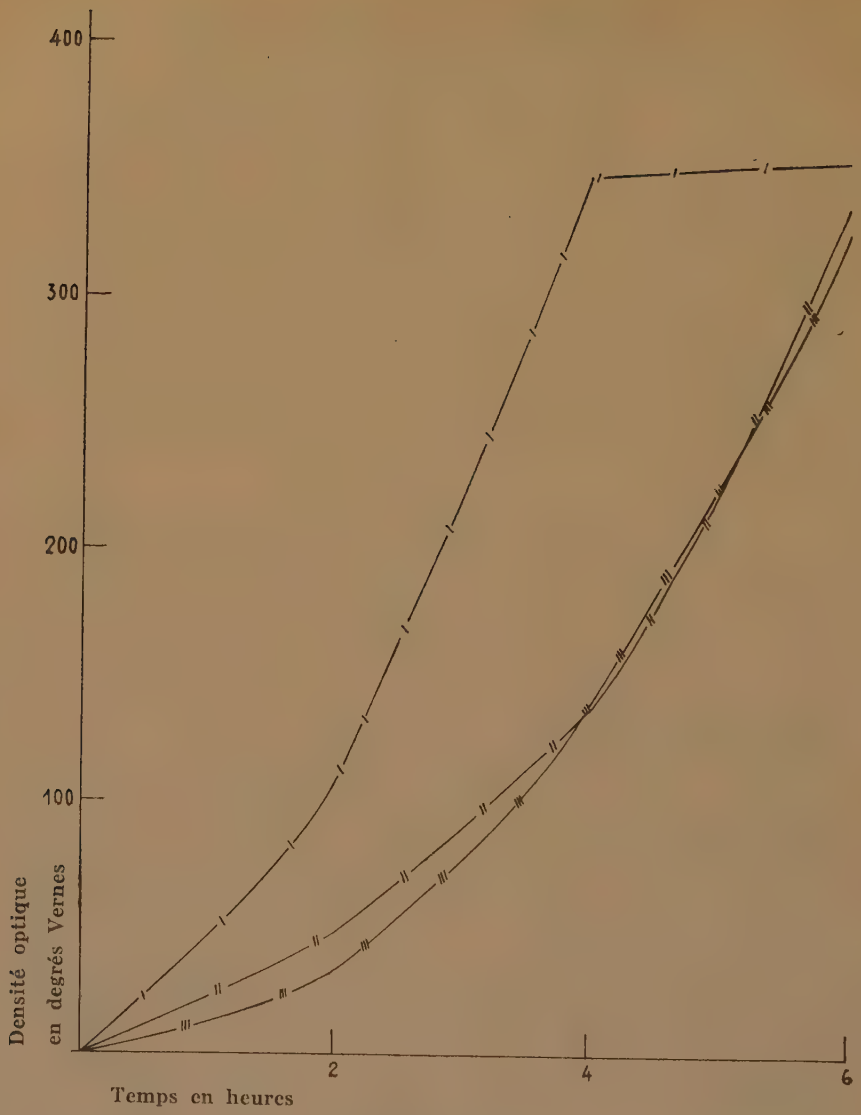
Variants obtenus après trente repiquages sur les milieux vitaminés ayant déterminé une résistance. Intensité néphélométrique du développement.

Variants	en 2 h.	en 4 h.	en 6 h.	Identification des courbes
Variant provenant du milieu cobalamine ...	106	346	351	——/——/——
Variant provenant du milieu biotine	48	136	333	——//——//——
Variant provenant du milieu méso-inositol ..	33	138	323	——///——///——

Graphique 3.

Variants divers étudiés. Intensité néphélométrique du développement.

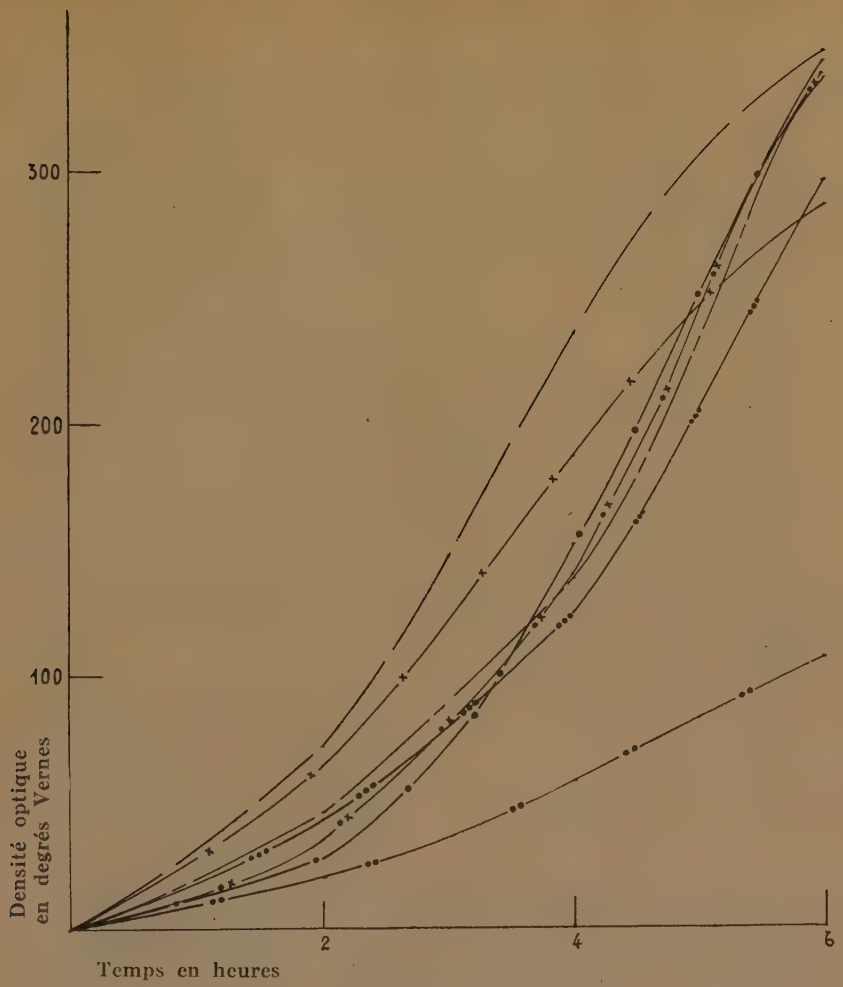
Variants	en 2 h.	en 4 h.	en 6 h.	Identification des courbes
Variant provenant du milieu thiamine, nicotinamide, cobalamine.	72	238	347	——— ———
Variant provenant du milieu thiamine, nicotinamide	46	138	337	——— — ——— —
Variant provenant de l'adaptation à la pénicilline, entraîné sur cobalamine	64	187	286	——— X ———
Variant provenant du milieu riboflavine, pyridoxol, pantothénate de calcium	43	125	296	———...———
Variant provenant du milieu méso-inositol, acide folique, biotine.	28	152	343	——— . ———
Variant provenant du milieu acide folique ..	20	58	107	———..———
Variant provenant du milieu méso-inositol, biotine	35	140	338	——— . X ———



Graphique 2.

Variants obtenus après trente repiquages sur les milieux vitaminés ayant déterminé une résistance. Intensité néphélométrique du développement.

—/—/— : variant provenant du milieu cobalamine.
—//—//— : variant provenant du milieu biotine.
—///—///— : variant provenant du milieu méso-inositol.



Graphique 3.

Variants divers étudiés après dix repiquages sur les milieux vitaminés. Intensité néphélométrique du développement.

——— ——— : variant provenant du milieu thiamine, nicotinamide, cobalamine.

——— — ——— — : variant provenant du milieu thiamine, nicotinamide.

———x——— : variant provenant de l'adaptation à la pénicilline, entraîné sur cobalamine.

———•••——— : variant provenant du milieu riboflavine, pyridoxol, pantothénate de calcium.

———•——— : variant provenant du milieu méso-inositol, acide folique, biotine.

———••——— : variant provenant du milieu acide folique.

———•x——— : variant provenant du milieu méso-inositol, biotine.

III. — CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Après avoir examiné quelques souches lactiques productrices d'antibiotique du point de vue de leur comportement envers la pénicilline, la streptomycine, le chloramphénicol et l'auréomycine, nous avons repris la souche *Streptococcus lactis* E III déjà utilisée au précédent chapitre, et nous avons recherché si cette souche pouvait, grâce à un entraînement à se multiplier dans un milieu additionné de diverses vitamines du groupe B, modifier ses caractères physiologiques en vue d'accroître sa résistance à ces quatre antibiotiques majeurs. Voici le résumé des résultats obtenus :

La thiamine, la nicotinamide, la riboflavine, le pyridoxol, le pantothénate de calcium, l'acide folique n'ont développé chez le streptocoque aucune formation de défense;

La cobalamine, la biotine, le méso-inositol ont augmenté chez le streptocoque sa résistance naturelle dans les proportions suivantes, après une série de 30 repiquages successifs biquotidiens :

Pour la cobalamine	9 fois à la pénicilline,
	25 fois à la streptomycine.
Pour la biotine	14 fois à la pénicilline,
	4 fois à la streptomycine.
Pour le méso-inositol	14 fois à la pénicilline,
	8 fois à la streptomycine.

Nous avons, également, étudié les courbes de croissance de ces différents variants, et nous avons constaté qu'une augmentation de la résistance n'avait pas comme corollaire obligatoire l'accroissement du rythme des divisions bactériennes pendant les premières heures; il se produit, au contraire, une diminution de ce rythme, sauf pour le variant résistant obtenu à l'aide de la cobalamine; enfin, si l'augmentation du nombre de passages en milieu vitaminé accroît la résistance, la vitesse de développement ne subit pratiquement pas de changements.

CHAPITRE IV

CONSÉQUENCES DE LA RÉSISTANCE ACQUISE

Nous essaierons, dans ce chapitre, de trouver des réponses à quelques questions posées par l'apparition d'une résistance aux deux antibiotiques pénicilline et streptomycine, obtenue grâce au passage de la souche *Streptococcus lactis* E III en milieux enrichis en cobalamine, biotine, méso-inositol.

I. — CONSERVATION DE LA RÉSISTANCE APRÈS REPIQUAGES SANS VITAMINES

Chacune des souches résistantes, issues de 30 repiquages en milieux survitaminés à la cobalamine, à la biotine et au méso-inositol, a été remise en culture dans le milieu glucosé tamponné mais non additionné de ces vitamines.

Après une série de 15 repiquages biquotidiens, nous avons soumis chacune de ces souches à l'action de la pénicilline et de la streptomycine, et nous avons constaté une perte de résistance pour la seule souche entraînée à la cobalamine, les autres souches n'ont pas accusé de différence.

Au bout de trente repiquages, l'affaiblissement de la résistance se manifeste chez les trois variants.

TABLEAU XVII

ETUDE COMPARATIVE DE LA CONSERVATION DE LA RÉSISTANCE.

VITAMINES	ANTIBIOTIQUES	RÉSISTANCE APRÈS TRENTE REPIQUAGES EN MILIEUX VITAMINÉS	RÉSISTANCE APRÈS QUINZE REPIQUAGES POSTÉRIEURS EN MILIEUX NON VITAMINÉS	RÉSISTANCE APRÈS TRENTE REPIQUAGES POSTÉRIEURS EN MILIEUX NON VITAMINÉS
Cobalamine	Pénicilline Streptomycine	6 U. 1 500 µg	2 U. 750 µg	1,50 U. 300 µg
Biotine	Pénicilline Streptomycine	10 U. 250 µg	10 U. 250 µg	6 U. 120 µg
Méso-inosit.	Pénicilline Streptomycine	10 U. 500 µg	10 U. 500 µg	7 U. 200 µg

L'affaiblissement, dans les conditions expérimentales, n'est pas total. Il reste une résistance de :

Pour la cobalamine ..... 2 fois à la pénicilline,
5 fois à la streptomycine.

Pour la biotine ..... 8 fois à la pénicilline,
2 fois à la streptomycine.

Pour le méso-inositol ..... 10 fois à la pénicilline,
3 fois à la streptomycine.

II. — ESSAIS D'ASSOCIATION DE VITAMINES

On pouvait se demander si diverses associations des vitamines permettaient d'augmenter les résistances que chacune d'entre elles prise séparément avait provoquées.

C'est pourquoi nous avons repris la souche d'origine *Streptococcus lactis* E III et nous l'avons, par dix repiquages biquotidiens, entraînée à se développer dans chacun des trois milieux glucosés tamponnés suivants :

— Un premier contenant le mélange cobalamine (10 µg/ml) et biotine (200 µg/ml);

— Un deuxième contenant le mélange cobalamine (10 µg par ml) et méso-inositol (0,001 g/ml);

— Un troisième contenant le mélange biotine (200 µg/ml) et méso-inositol (0,001 g/ml).

Par comparaison avec les résultats obtenus précédemment après repiquages en milieux ne contenant qu'une seule vitamine, nous avons observé une augmentation de la résistance à la pénicilline avec le mélange biotine méso-inositol, et une augmentation de la résistance à la streptomycine pour chacun des mélanges cobalamine biotine, cobalamine méso-inositol, biotine méso-inositol.

Le tableau ci-dessous résume les résultats.

TABLEAU XVIII

ETUDE COMPARATIVE DE LA RÉSISTANCE OBTENUE PAR LES VITAMINES SEULES ET ASSOCIÉES, APRÈS DIX REPIQUAGES.

ANTIBIOTIQUES	COBALAMINE	BIOTINE	MÉSO-INOSITOL	COBALAMINE ET BIOTINE	COBALAMINE ET MÉSO-INOSITOL	BIOTINE ET MÉSO-INOSITOL
Pénicilline	2 U.	2 U.	2 U.	2 U.	2 U.	5 U.
Streptomycine	250 µg	200 µg	80 µg	400 µg	400 µg	400 µg

Après trente repiquages dans les mêmes conditions, l'augmentation de la résistance s'est poursuivie.

TABLEAU XIX

ETUDE COMPARATIVE DE LA RÉSISTANCE OBTENUE PAR LES VITAMINES SEULES ET ASSOCIÉES, APRÈS TRENTE REPIQUAGES.

ANTIBIOTIQUES	COBALAMINE	BIOTINE	MÉSO-INOSITOL	COBALAMINE ET BIOTINE	COBALAMINE ET MÉSO-INOSITOL	BIOTINE ET MÉSO-INOSITOL
Pénicilline	6 U.	10 U.	10 U.	8 U.	15 U.	13 U.
Streptomycine	1 500 µg	250 µg	500 µg	2 000 µg	1 200 µg	800 µg

III. — ESSAIS DES VARIANTS RÉSISTANTS ENVERS DIVERS ANTIBIOTIQUES AUTRES QUE LES QUATRE PRINCIPAUX

Les variants entraînés à se reproduire en milieux contenant de la cobalamine, de la biotine, et du méso-inositol accroissent notablement leur résistance, nous l'avons vu, à la pénicilline et à la streptomycine, mais non à l'auréomycine ni au chloramphénicol. Cette résistance, cependant, se manifeste peut-être vis-à-vis d'autres antibiotiques. C'est pourquoi nous avons continué cette étude avec les antibiotiques suivants : terramycine, néomycine, tyrothricine, bacitracine [1].

Chacun des variants résistants (obtenus après dix et trente repiquages en milieux contenant la cobalamine, la biotine, le méso-inositol) a été mis en culture dans les milieux glucosés tamponnés renfermant individuellement terramycine, néomy-

TABLEAU XX

RÉSISTANCE COMPARÉE DES VARIANTS RÉSISTANTS DE *Streptococcus lactis* E III ENVERS LA TERRAMYCINE, LA NÉOMYCINE, LA TYROTHRICINE ET LA BACITRACINE.

ANTIBIOTIQUES	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR COBALAMINE	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR BIOTINE	SOUCHE ENTRAÎNÉE SUR MÉSO-INOSITOL
Terramycine ...	0	0	0
Néomycine	+	0	0
Tyrothricine ...	0	0	0
Bacitracine	+	0	0

(1) A l'exception de la terramycine (oxytétracycline), dont le mécanisme d'action est presque identique à celui de l'auréomycine (chlortétracycline), le mode d'action des autres antibiotiques : néomycine, bacitracine, tyrothricine est peu connu; jusqu'à présent, il a été démontré que la tyrothricine arrêtait l'accumulation de l'acide adénosine triphosphorique impliqué dans de nombreux processus, et qu'elle modifiait, comme la bacitracine, la perméabilité de la membrane bactérienne; de plus, la bacitracine inhibait l'absorption de l'acide glutamique, comme le fait la pénicilline.

(Renseignements puisés dans les revues générales citées p. 13.)

cine, tyrothricine, bacitracine aux doses inhibitrices établies précédemment, au chapitre II, et nous avons constaté que, seule, la souche entraînée sur cobalamine, après dix et trente repiquages, résiste à l'action de la néomycine et de la bacitracine (voir tableau récapitulatif p. 82).

Mise au contact de concentrations croissantes de néomycine et de bacitracine, la souche entraînée après trente repiquages sur milieux à la cobalamine est résistante à :

Néomycine ..... 262,5 µg par ml
Bacitracine ..... 10 unités par ml

Soit alors :

Pour la néomycine : 70 fois la résistance initiale de la souche d'origine;
Pour la bacitracine : 10 fois la résistance initiale de la souche d'origine.

IV. — ÉTUDE DE LA TENEUR EN ACIDE RIBONUCLÉIQUE DES VARIANTS RÉSISTANTS

Parmi les caractères biochimiques propres aux souches résistantes à la pénicilline et à la streptomycine, leur haute teneur en acide ribonucléique est remarquable, par comparaison avec les souches sensibles; mais, alors que les protides, les orthophosphates, les mononucléotides à ribose, les mononucléotides à désoxyribose et l'acide désoxyribonuclénique restent pratiquement inchangés chez la souche streptomycino-résistante, les protides, les composés phosphoriques acido-solubles, et les mononucléotides puriques s'accumulent chez la souche pénicillino-résistante (Beljanski [6, 7]).

Nous avons pensé qu'il était nécessaire d'effectuer le dosage de l'acide ribonucléique chez la souche de *Streptococcus lactis* E III d'origine et sur chacun de ses variants résistants obtenus par trente passages en milieux enrichis en cobalamine, en biotine et en méso-inositol.

Pour la souche d'origine et pour chacun de ses trois variants, nous avons pratiqué trois dosages d'acide ribonucléique, chacun de ces dosages correspond à un stade différent de développement microbien, soit après quatre heures, après six heures et après huit heures de culture. Toutes les cultures ont été pratiquées à partir d'un même *inoculum*

(même nombre de gouttes comptées à la pipette Duclaux), ce dernier en provenance d'un repiquage préalable de quinze heures. Pour chaque cas, le volume de bouillon glucosé tamponné utilisé est de 40 ml, et l'ensemencement est de XL gouttes; après le temps de culture, le bouillon est centrifugé afin de réunir les corps microbiens; le culot est ensuite lavé deux fois à l'eau distillée, puis remis en suspension dans 5 ml d'acide trichloracétique à 5 p. 100 pendant quinze heures à la glacière; après centrifugation, le culot est mis en suspension dans 5 ml du mélange alcool (3 volumes) et éther (1 vol.) pendant vingt minutes au bain-marie à 70° C; après une nouvelle centrifugation, et élimination du solvant, l'acide ribonucléique est extrait du culot par deux fois 0,75 ml d'acide trichloracétique à 5 p. 100 à chaud, quinze minutes au bain-marie à 90° C; après refroidissement et centrifugation, le liquide est transvasé dans un autre tube, puis complété avec de l'acide trichloracétique à 1,5 ml; cette technique est inspirée de Schneider [132]. L'acide ribonucléique est alors dosé directement dans l'extrait trichloracétique, par colorimétrie à l'aide de la réaction à l'orcinol :

1,5 ml de l'extrait trichloracétique + 3 ml de réactif par tube, on place les tubes au bain-marie bouillant pendant trois minutes, et on établit dans les mêmes conditions une gamme étalon d'acide ribonucléique en concentrations croissantes.

Ce réactif à l'orcinol se prépare extemporanément (1).

Après être restés trois minutes au bain-marie bouillant, tous les tubes sont refroidis à l'eau courante, et la lecture se pratique à l'électrophotomètre, en transvasant chaque tube dans la cuve de 1 cm d'épaisseur, avec écran rouge, le zéro de l'appareil étant réglé sur un essai à blanc, ne contenant pas d'acide ribonucléique.

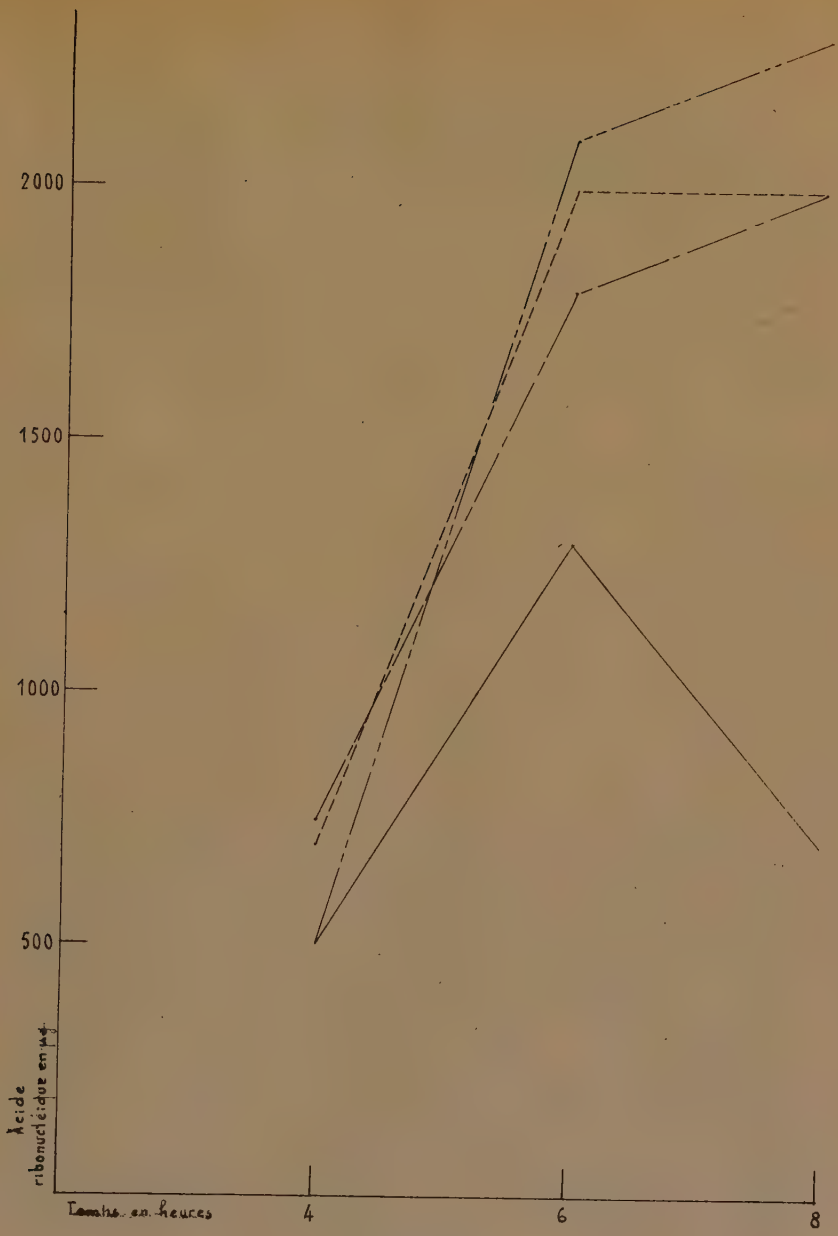
Les résultats obtenus se trouvent dans le tableau XXI.

De ce tableau il ressort clairement que, toutes conditions de culture étant égales, les variants résistants contiennent davantage d'acide ribonucléique que la souche d'origine, et conservent ce taux plus élevé plus longtemps.

Les différents taux d'acide ribonucléique sont traduits sur le graphique n° 4.

---

(1) Formule du réactif à l'orcinol : on dissout 100 mg de $FeCl_3$, 6 H_2O dans 100 ml de HCl de densité 1,19; d'autre part, on fait une solution à 6 p. 100 d'orcinol dans l'éthanol à 95°; on ajoute 3,5 ml de solution d'orcinol à 100 ml de la solution acide.



Graphique 4.

Teneur en acide ribonucléique de *Streptococcus lactis* E III et de ses variants résistants obtenus après trente repiquages sur les milieux vitaminés.

——————— : souche d'origine.
—— —— —— —— : variant entraîné sur milieu à la cobalamine.
—— – —— – —— : variant entraîné sur milieu à la biotine.
—— – – —— – – —— : variant entraîné sur milieu au méso-inositol.

TABLEAU XXI

TENEUR EN ACIDE RIBONUCLÉIQUE DE LA SOUCHE D'ORIGINE *Streptococcus lactis* E III ET DE SES VARIANTS RÉSISTANTS.

SOUCHE ET SES VARIANTS	APRÈS 4 H. DE CULTURE	APRÈS 6 H. DE CULTURE	APRÈS 8 H. DE CULTURE	IDENTIFICATION DES COURBES DU GRAPHIQUE 4
Souche d'origine	500 µg	1 300 µg	700 µg	————
Variant entraîné sur milieu à la cobalamine	700 µg	2 000 µg	2 000 µg	— — —
Variant entraîné sur milieu à la biotine	750 µg	1 800 µg	2 000 µg	— — —
Variant entraîné sur milieu au méso-inositol	500 µg	2 100 µg	2 300 µg	— — — —

V. — ÉTUDE DE LA FERMENTATION DES GLUCIDES

L'importance de la fermentation des substances glucidiques par les ferments lactiques n'est plus à démontrer; une étude comparative de cette fermentation par la souche d'origine de *Streptococcus lactis* E III et par un variant résistant s'imposait; nous avons, à cet effet, choisi le variant résistant obtenu par trente passages sur milieu à la cobalamine, car il présentait comme caractéristiques intéressantes essentielles la rapidité de sa croissance et la faculté de résister à quatre antibiotiques.

Nous avons disposé des séries de tubes contenant 10 ml de milieu tamponné [1], ensemencés les uns avec la souche d'origine, les autres avec le variant résistant obtenu avec la cobalamine; chaque tube était additionné de X gouttes de glucide expérimenté, et de III gouttes de solution de rouge de phénol comme indicateur.

(1) Ce milieu tamponné a la même composition que le milieu glucosé tamponné, mais sans glucose; M. CASSAGNE, du Service des Milieux de Culture de l'Institut Pasteur de Paris, a bien voulu nous le préparer spécialement.

L'examen des tubes a eu lieu au bout de huit heures de culture, puis tous les jours jusqu'au sixième jour inclus.

Le tableau ci-dessous [1] résume les résultats (le signe + indique un virage net du milieu, le signe ± indique un virage faible); le variant utilisé diffère de la souche d'origine par la précocité des fermentations et aussi par son aptitude, à l'inverse de la souche d'origine, à fermenter le saccharose, le mannitol et le dulcitol.

Ces essais ont été répétés une seconde fois, et ont donné les mêmes résultats.

TABLEAU XXII

FERMENTATION COMPARÉE DE GLUCIDES ET ALCOOLS POLYVALENTS PAR LA SOUCHE D'ORIGINE ET PAR LE VARIANT ENTRAÎNÉ SUR COBALAMINE.

SUBSTANCES GLUCIDIQUES	*Streptococcus lactis* E III SOUCHE D'ORIGINE							*Streptococcus lactis* E III VARIANT ENTRAÎNÉ SUR COBALAMINE						
	8 h.	24 h.	48 h.	3 j.	4 j.	5 j.	6 j.	8 h.	24 h.	48 h.	3 j.	4 j.	5 j.	6 j.
Arabinose..	0	0	0	0	±	±	+	0	+	+	+	+	+	+
Mannitol....	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
Lévulose.....	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose.....	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose.....	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose.....	0	0	0	0	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose...	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+
Dulcitol.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	±
Xylose.....	0	0	0	0	0	±	+	0	0	0	0	0	±	±
Saccharose.	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
Amidon.....	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+

En milieu tamponné sans glucide, seul le variant entraîné sur milieu à la cobalamine se développe parfaitement bien, pendant quatre repiquages au moins (sans virage du rouge

(1) Dans ce tableau, le mannitol et le dulcitol figurent aux côtés des glucides proprement dits.

de phénol), tandis que la souche d'origine ne se développe pas ou, tout au plus, dans quelques tubes, donne naissance à une culture chétive dès le premier réensemencement; la croissance de la souche d'origine redevient normale dans ces milieux sans glucide, si on y ajoute du ribose à la dose, par exemple, de 0,01 g par ml.

C'est vraisemblablement en raison de son extrême richesse en substances nutritives, en nucléoprotides, que ce variant maintient son développement, même en milieu défavorable.

Cette remarquable activité n'a pas toujours comme conséquence l'exaltation de toutes les propriétés; c'est ainsi que l'intensité de la réaction de Voges-Proskauer en milieu de Clark et Lubs se trouve, paradoxalement, diminuée; la simple appréciation de cette intensité, quoique grossière, est clairement suffisante pour juger de cet affaiblissement de la production d'acétylméthylcarbinol, ainsi qu'en témoigne le tableau suivant :

TABLEAU XXIII

PRODUCTION COMPARÉE D'ACÉTYLMÉTHYLCARBINOL PAR LA SOUCHE D'ORIGINE ET PAR LE VARIANT ENTRAÎNÉ SUR COBALAMINE.

Streptococcus lactis E III....	APPRÉCIATION DE LA RÉACTION DE VOGES-PROSKAUER			
	EN 1 J.	EN 2 J.	EN 3 J.	EN 4 J.
Souche d'origine	+	++	++	+++
Variant (cobalamine)	+	+	+	+

Un autre problème, dépendant de la fermentation des glucides, qui restait à étudier est celui de l'évaluation de l'acidité formée aux dépens, par exemple, du lactose.

Pour cette détermination, nous avons utilisé la méthode couramment employée en laiterie qui exprime l'acidité en degrés Dornic, et dont voici le principe :

Dans une fiole, 10 ml du liquide à examiner sont additionnés de III à IV gouttes d'une solution alcoolique de phénolphtaléine à 2 p. 100; on y fait tomber goutte à goutte, à l'aide d'une burette, une solution de soude à 4,44 g pour 1 000,

jusqu'à teinte rosée; 1/10 de ml de cette solution alcaline sature 1 mg d'acide lactique; le nombre de 1/10 de ml de cette solution alcaline écoulée exprime le degré Dornic, soit les décigrammes d'acide lactique au litre.

Nous avons calculé l'acidité, en degrés Dornic, déployée par le variant résistant obtenu par trente passages sur milieu à la cobalamine dans les différents cas suivants :

— En milieu seul,
— En milieu additionné de pénicilline 5 U. par ml,
— En milieu additionné de streptomycine 1.000 µg par ml,
— En milieu additionné de néomycine 225 µg par ml,
— En milieu additionné de bacitracine 10 U. par ml.

Le milieu est constitué du milieu tamponné, décrit plus haut, dans lequel est ajouté 0,015 g de lactose par ml.

Les résultats obtenus avec mention des *p*H, sont consignés dans le tableau ci-après :

TABLEAU XXIV

EVALUATION DE LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR LE VARIANT DE *Streptococcus lactis* RENDU RÉSISTANT AUX ANTIBIOTIQUES PAR ENTRAÎNEMENT DANS LE MILIEU A LA COBALAMINE.

*p*H ET DEGRÉS DORNIC	MILIEU SEUL	MILIEU AVEC PÉNICILLINE	MILIEU AVEC STREPTOMYCINE	MILIEU AVEC NÉOMYCINE	MILIEU AVEC BACITRACINE
*p*H en 24 h.	5,1	5,2	6,7	6,7	6,7
*p*H en 48 h.	5	5	5	5,2	6,5
Degrés Dornic en 24 h.	80°	70°	35°	30°	25°
Degrés Dornic en 48 h.	80°	75°	85°	75°	35°

A titre comparatif, nous avons effectué les mesures de *p*H et de degré Dornic, de vingt-quatre heures, dans les milieux, avec et sans vitamines, ensemencés avec la souche d'origine, non résistante.

Voici les résultats :

TABLEAU XXV

Evaluation de la production d'acide lactique par la souche d'origine.

*p*H et degré Dornic	Milieu seul	Milieu avec cobalamine (20 µg par ml)
*p*H en 24 h.	5	4,5
Degré Dornic en 24 h...	85°	90°

A la lecture de ces chiffres, il apparaît manifestement que l'acide lactique se développe pleinement en vingt-quatre heures dans le milieu avec la pénicilline, et en quarante-huit heures dans les milieux avec streptomycine et avec néomycine; seul le milieu avec bacitracine n'a témoigné que d'une faible acidité.

VI. — CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Dans ce chapitre IV, nous avons examiné quelques caractères des variants résistants que nous avons obtenus; nous avons observé qu'après quinze repiquages en milieux non vitaminés, le variant provenant du milieu à la cobalamine devenait moins résistant à la pénicilline et à la streptomycine, les deux autres variants provenant du milieu à la biotine et du milieu au méso-inositol gardant la même résistance; après trente repiquages en milieux non vitaminés, la diminution de la résistance se manifeste chez les trois variants; d'autre part, divers mélanges de ces vitamines augmentent la résistance à la streptomycine, de façon plus importante que chaque vitamine isolément; les trois variants ont été soumis à l'action de quelques autres antibiotiques, et, seul, le variant provenant du milieu à la cobalamine possède également une résistance à la néomycine et à la bacitracine; comparés à la souche d'origine, les trois variants possèdent une plus haute teneur en acide ribonucléique; le variant résistant obtenu avec la cobalamine a été choisi pour l'étude de la fermenta-

tion des glucides, et nous avons observé l'apparition de caractères spéciaux envers le saccharose, le mannitol, le dulcitol, la réaction de Voges-Proskauer, et la formation en présence d'antibiotiques, de l'acidité lactique.

VII. — DISCUSSION DES CHAPITRES III ET IV

Dans cette partie de notre travail, nous avons obtenu, à partir de la souche d'origine, des variants résistants grâce à leur croissance en milieux enrichis en cobalamine, en biotine, et en méso-inositol. Chacun de ces variants contient un taux d'acide ribonucléique supérieur à celui de la souche d'origine. On peut, donc, se demander comment chacune de ces vitamines peut intervenir dans l'élaboration de ce taux. Cependant, il apparaît actuellement difficile d'établir une liaison entre la présence en excès de ces vitamines et l'élévation de la quantité d'acide ribonucléique. En effet, la cobalamine intervient bien dans la synthèse des acides nucléiques, mais au niveau de la liaison osidique, entre désoxysucre et base (Wolff [153]) et pour les désoxyribosides seulement, dont la quantité augmente sous son action, tandis que la teneur en acide ribonucléique reste inchangée (Wacker et coll. [150]). Dans cette synthèse complexe, l'acide folique joue également un rôle; or, l'entraînement de la souche à croître en présence d'acide folique n'a pas donné lieu à l'établissement d'une résistance. Mais, il est possible que l'acide folique n'ait pas traversé la membrane bactérienne. D'autre part, le méso-inositol et la biotine sont des constituants, l'un du « Bios I », l'autre du « Bios II », et, à ce titre, sont des facteurs de croissance qui augmentent souvent le rendement des cultures, en présence d'autres facteurs du groupe B. La biotine interviendrait au niveau de la synthèse de l'acide oxalacétique (condensation de l'acide pyruvique avec le gaz carbonique).

Toutefois, il ne semble pas que le degré de résistance soit en relation avec un plus grand pouvoir de développement, puisque si la courbe de croissance de l'un des variants résistants se situe au-dessus de celle de la souche d'origine, les deux autres variants résistants ont une courbe de croissance inférieure. Cette constatation rejoint les résultats de Beljanski [8] qui a obtenu des souches résistantes ayant le même taux de croissance que les souches sensibles. De plus, ce même auteur conclut qu'il n'y a pas de rapport entre la teneur en

acide ribonucléique et le taux de divisions cellulaires : la vitesse de ces divisions dépendrait d'autres facteurs. Nos recherches confirment ces résultats. Chez la souche non résistante, d'origine, les valeurs d'acide ribonucléique passent par un maximum, pour retomber ensuite à un taux plus bas, comme Beljanski l'avait établi, en suivant, pendant la croissance, les variations du rapport μg de ribose/mg d'azote total des bactéries; la teneur en acide ribonucléique de nos variants résistants est sensiblement la même pour tous, quel que soit le procédé d'obtention de ces variants, et cette teneur, plus élevée que chez la souche d'origine, se maintient à son taux plus longtemps.

La résistance obtenue par entraînement en milieu enrichi en cobalamine ouvre un chapitre spécial de recherche, en raison même du fait que du cobalt entre dans la formule de la cobalamine, et ceci indépendamment du rôle propre de la cobalamine dans le métabolisme. En effet, le cobalt active la croissance bactérienne (Hendlin [57]), améliore la biosynthèse microbienne de la cobalamine (Folkers [37]), et, aussi, son élaboration biochimique (Harper [55]), mais augmente la sensibilité des germes à la pénicilline (Pratt et Dufrénoy [123, 122]) et à la streptomycine (Kammerer et Eberle [71]), d'où son application en thérapeutique antibiotique (Chouard [23]); cette action de renforcement de l'activité antibiotique se situerait au niveau de la synthèse microbienne des nucléoprotides (Faguet [36]), et aussi par formation, cependant discutée, de complexe entre le cobalt et les groupements —SH des systèmes enzymatiques (Levy et coll. [82]).

On conçoit, donc, tout l'intérêt de ce problème, en relation avec l'action de la cobalamine : d'une part, le cobalt augmente dans les milieux de culture la croissance microbienne, et la biosynthèse de la cobalamine, qui permet aux micro-organismes, nous l'avons démontré, une plus grande résistance à la pénicilline et à la streptomycine; et d'autre part, le cobalt, par lui-même, renforce ces antibiotiques. Il nous paraissait nécessaire de faire le rapprochement de ces effets antagonistes, et d'en souligner l'importance.

Nous avons constaté, aussi, que seul le variant entraîné en milieu vitaminé à la cobalamine possédait, également, une plus grande résistance à la néomycine et à la bacitracine. Cette résistance à la néomycine semble s'expliquer par le fait que ce corps donne des bases que l'on considère comme des

biosamines comparables à la streptobiosamine. Comme la pénicilline et la streptomycine, la néomycine, nous l'avons vu, est inhibée par la présence de nucléinate de sodium, et de cystéine. Une résistance croisée à la streptomycine et à la néomycine avait déjà été observée par Iverson et Waksman [65] ainsi que par Pagano [113] chez les souches adaptées à l'un ou l'autre de ces deux antibiotiques. Mais on peut se demander pourquoi, seule, la souche provenant du milieu à la cobalamine possède cette propriété, et non les deux autres variants.

Quant à la résistance à la bacitracine propre également à ce variant, elle est peu commune, puisque Turpin et Velu [144] n'ont relevé aucune citation de résistance croisée entre la bacitracine et les autres antibiotiques.

Si l'augmentation du taux d'acide ribonucléique est bien la traduction biochimique d'augmentation de la résistance, il reste à expliquer pourquoi une augmentation similaire chez nos trois variants n'a pas déterminé les mêmes résistances : le variant provenant du milieu à la cobalamine est devenu plus résistant à la pénicilline, à la streptomycine, à la néomycine et à la bacitracine, tandis que les variants provenant des milieux à la biotine et au méso-inositol ne sont devenus plus résistants qu'à la pénicilline et à la streptomycine. Nous avons rappelé l'analogie de la streptomycine et de la néomycine et aussi le mécanisme d'action partiel connu de la bacitracine, analogue à celui de la pénicilline (*cf.* note de la p. 82) ; dans ces conditions on peut élaborer l'hypothèse suivante : un taux élevé d'acide ribonucléique ne suffit pas, par lui-même, à provoquer l'apparition d'une résistance; il faut, de plus, envisager la composition des acides ribonucléiques formés, qui répondraient ainsi plus ou moins électivement aux phénomènes envisagés; une telle étude se révèle particulièrement laborieuse : dans une revue sur la structure des acides ribonucléiques, Boulanger et Montreuil [13] en ont montré toute la complexité.

Nous trouverions ainsi, dans notre hypothèse, la confirmation de ce que Machebœuf [85], s'appuyant sur les travaux de Park et Johnson [116], avait déjà avancé en supposant que « l'acide ribonucléique accumulé chez les résistants était d'une nature chimique différente de celle des polyribonucléotides des sensibles » ; il serait donc nécessaire d'examiner la structure des acides ribonucléiques formés sous l'influence de la cobalamine, du méso-inositol, et de la biotine.

Ce que nous supposons est très plausible, puisque Rashba et Galkina [125], examinant les acides nucléiques de cinq variants d'un *Escherichia coli*, constatent que chacun d'eux présente des caractères particuliers, différents de la souche d'origine. Il serait également nécessaire d'élucider les rapports que pourraient présenter entre eux les acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques, et leur inter-relation éventuelle; Hershey [58] soutient la conservation des acides nucléique et désoxyribonucléique au cours de la croissance bactérienne, sans passage de l'un vers l'autre, tandis que Grossman et Hawkins [51] admettent la formation de désoxyribonucléosides à partir de ribonucléosides.

On sait, depuis les remarquables recherches de Hotchkiss, toute l'importance de l'acide désoxyribonucléique dans la transmission des caractères génétiques, et c'est peut-être par ce moyen que l'héritabilité de la résistance acquise est assurée, quoique d'une durée limitée, chez nos variants; à ce sujet Cavalli [21] a développé les arguments des diverses thèses en présence relatives à la transmission des caractères acquis, et nous pensons que, dans nos essais, la conservation de la résistance resterait tributaire du maintien, dans le micro-organisme, d'une quantité suffisante d'acides nucléiques [1]. Ainsi donc, chez les germes résistants, les acides ribonucléique et désoxyribonucléique se trouveraient impliqués tous les deux.

De plus, une des conséquences du changement dans le métabolisme des acides nucléiques de nos variants est illustrée par le comportement typique de notre variant issu du milieu à la cobalamine, envers les substances glucidiques et les alcools polyvalents; en effet, ce variant se distingue de la souche d'origine par son aptitude constante [2] à fermenter

(1) Les phénomènes relatifs à l'acquisition et à la conservation de la résistance sont très complexes et, bien souvent, on en est réduit à des hypothèses; comment expliquer rationnellement, par exemple, le type de résistance « streptomycinique », brutal et rapide, par opposition au type « pénicillinique » lent et progressif ? Et si l'on ajoute à ces deux modalités extrêmes des types mixtes, on comprendra aisément la difficulté des problèmes à résoudre *(cf.* Turpin et Velu [144]); d'ailleurs, nous-même, lors de nos très nombreuses séries de contrôle, nous avons, parfois, observé sporadiquement un développement subit de la souche d'origine en présence de certaines concentrations élevées de streptomycine et de néomycine. Dans ces conditions, nos vitamines (cobalamine, biotine, méso-inositol) pourraient être considérées comme agents mutagènes, dont le rôle serait de favoriser l'apparition de mutants résistants, qui n'apparaîtraient, sans elles, que d'une façon spontanée.

(2) On sait, en effet, que pour une même souche microbienne, la capacité à fermenter certains glucides, présente parfois des irrégularités, surtout selon la composition des milieux de culture.

le saccharose, le dulcitol, le mannitol; précisément Marmur et Hotchkiss [92] ont réussi à transformer des cellules de pneumocoques incapables d'utiliser le mannitol en cellules capables de métaboliser ce composé grâce à un extrait d'acide désoxyribonucléique fortement polymérisé, isolé d'une souche mutante métabolisant le mannitol.

Certes, la faculté supplémentaire de fermenter ces substances ne dépend peut-être pas toujours de l'augmentation du taux d'acides nucléiques des souches considérées, puisque, au contraire, les souches résistantes à la pénicilline, par exemple, voient décliner leurs propriétés fermentaires (Klimek et coll. [73], Mc Veigh et Hobdy [100]); cette modification du métabolisme glucidique serait, par ailleurs, liée au ralentissement de la croissance, généralement observé, chez les souches résistantes.

Un autre caractère particulier de notre variant examiné, de croissance cependant rapide, à signaler, est la diminution de sa production d'acétylméthylcarbinol; ce caractère est-il dépendant de la résistance ?

Scopes et Hinshelwood [133] avaient remarqué que des souches de *Klebsiella aerogenes* rendues résistantes à la proflavine devenaient incapables de former de l'acétylméthylcarbinol, et de leur côté, Seelemann et Timm [134] avaient observé que, en industrie laitière, des souches obtenues résistantes à la pénicilline, par adaptation progressive, perdaient leurs propriétés de développer l'arôme. (Est-ce imputable à la diminution du rythme de croissance des souches résistantes ?)

Sans reprendre toutes les théories de formation de l'acétylméthylcarbinol et du diacétyle, récemment revues par Letourneur [81], nous pouvons, toutefois, suggérer que notre variant, tout en produisant de l'acétylméthylcarbinol avec la même intensité que la souche d'origine, verrait la reconversion de ce composé en butanediol. Cette transformation du diacétyle en butanediol est liée à un plus grand pouvoir réducteur du variant; en effet, la culture sur milieu au bleu de méthylène fait apparaître une décoloration plus rapide et plus complète du milieu par le variant résistant à la cobalamine que par la souche d'origine; de même, en culture dans le lait tournesolé, la réoxydation du colorant, après sa réduction, est plus lente pour ce variant que pour la souche d'origine.

Quant à l'évaluation de l'acidité lactique formée, en pré-

sence d'antibiotique, son maximum atteint au bout de quarante-huit heures dans les milieux à la streptomycine et à la néomycine n'est que le reflet du développement microbien lui-même, car le streptocoque, dans le milieu à la pénicilline, croît beaucoup plus vite et, par conséquent, forme rapidement de l'acide lactique; et sur milieu à la bacitracine, sa croissance est bien plus lente. La valeur des *p*H, par ailleurs, traduit le même phénomène.

Faisant suite à ce mode d'obtention de résistance par l'intermédiaire de vitamines du groupe B, un problème d'ordre général se pose : peut-on appliquer les résultats obtenus à d'autres espèces, notamment à celles qui sont pathogènes ? Selon Di Raimondo [27, 28] la résistance à la pénicilline de *Micrococcus pyogenes*, var. *aureus*, est augmentée par la présence de pyridoxol, d'amide nicotinique, d'acide folique *in vitro* et *in vivo*, ou de cobalamine *in vivo*, et même d'acide para-aminobenzoïque *in vitro;* signalons, au passage, que cette dernière action antipénicilline de l'acide para-aminobenzoïque se trouve en contradiction avec les résultats de Boyer et Sureau [14]; ces derniers auteurs ont rapporté l'action favorisante de l'acide para-aminobenzoïque envers la pénicilline dont l'effet se trouvait renforcé du fait que l'acide para-aminobenzoïque stimule la multiplication des bactéries et permet à la pénicilline d'agir électivement à la phase logarithmique de croissance. Les autres vitamines employées par Di Raimondo (pyridoxol, amide nicotinique, acide folique) sont restées inefficaces dans nos essais; et, de plus, des résultats satisfaisants ont été obtenus avec la biotine et le méso-inositol.

Tout ceci conduit à penser qu'un enrichissement en vitamines peut renforcer chez les espèces pathogènes leur résistance aux antibiotiques, mais que ces vitamines ne sont pas nécessairement les mêmes pour toutes les espèces microbiennes. Nous avons, d'ailleurs, vérifié avec *Serratia marcescens* (1) le bien-fondé de cette théorie.

---

(1) La souche de *Serratia marcescens* nous a été aimablement adressée par M. Girard, Service des Fermentations, Institut Pasteur, Paris.

Serratia marcescens est un bacille Gram négatif possédant une résistance originelle élevée à la pénicilline et à la bacitracine. Ce bacille se reproduit parfaitement bien en milieu glucosé tamponné de l'Institut Pasteur.

Nous avons procédé à l'étude de la souche avant et après trente repiquages en milieux vitaminés, envers les mêmes antibiotiques que

On peut donc dire que ces vitamines sont en liaison étroite avec le métabolisme biochimique propre à chacune des espèces envisagées. Si l'on suppose que les points d'attaque des antibiotiques sont les mêmes, quelle que soit l'espèce, et si l'on admet que l'augmentation de la résistance se traduit d'une façon générale par un taux plus élevé d'acide ribonucléique, on est amené à penser que les facteurs déterminant cette augmentation d'acide ribonucléique varient selon le potentiel cellulaire des diverses espèces et la composition vitaminique du milieu.

---

ceux utilisés pour le *Streptococcus lactis* E III, et en observant les mêmes conditions de travail que précédemment. Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XXVI

Antibiotiques	Concentration inhibitrice par millilitre de la souche d'origine	Résistance acquise par millilitre de la souche entraînée		
		méso-inositol	biotine	cobalamine
Pénicilline.....	4 000 U.	4 000 U.	4 000 U.	3 000 U.
Streptomycine	100 µg	150 µg	500 µg	150 µg
Néomycine.....	60 µg	120 µg	300 µg	100 µg
Bacitracine.....	400 U.	500 U.	400 U.	400 U.

Les dosages d'acide ribonucléique pratiqués sur la souche d'origine et sur chacun de ces variants n'offrent pas de différences marquées.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le but de ce travail était la recherche, à l'aide de ferments lactiques, de composés capables d'inhiber, par voie métabolique, en milieu liquide, l'action des antibiotiques : pénicilline, streptomycine, chloramphénicol et auréomycine.

Après avoir rappelé les travaux antérieurs, nous avons commencé nos recherches personnelles par le choix d'un milieu de culture capable de convenir aux espèces étudiées.

Ensuite, nous avons essayé divers métabolites en addition aux milieux de culture, et nous avons observé que, de tous ceux que nous avons utilisés : nucléinate de sodium, cystéine, glutathion, cobalamine, sérum sanguin, complexes naturels (poudre de cervelle, hydrolysat de caséine, peptone pancréatique, foie de lapin), complexe de vitamines B, désoxycorticostérone, réductose, seuls le nucléinate de sodium et la cystéine, en concentration appropriée, peuvent neutraliser l'action de la pénicilline et de la streptomycine, mais non du chloramphénicol ni de l'auréomycine. De plus, la réductose empêche l'action neutralisante du nucléinate de sodium, alors que d'autres abaisseurs du rH_2, tels l'acide ascorbique et l'acide succinique, ne montrent pas le même effet.

Dans d'autres séries expérimentales, nous avons recherché si un micro-organisme pouvait, par entraînement à se multiplier en milieux contenant des vitamines B, acquérir une résistance aux antibiotiques, et nous avons constaté l'efficacité de la cobalamine, de la biotine, du méso-inositol, à l'exclusion des vitamines B 1, PP, B 2, B 6, pantothénate de calcium, acide folique. La résistance concerne la pénicilline et la streptomycine, et non le chloramphénicol ni l'auréomycine.

Enfin, nous avons examiné quelques caractères des variants résistants obtenus par ce procédé, et nous avons observé les particularités suivantes : l'accroissement de la résistance ne

diminue pas nécessairement le rythme des divisions bactériennes pendant les premières heures; après plusieurs repiquages en milieux non vitaminés les variants voient leur résistance diminuer; le mélange des vitamines, cobalamine, biotine, et méso-inositol augmente la résistance à la streptomycine plus intensément que chaque vitamine isolée; le variant provenant du milieu à la cobalamine possède, aussi, une résistance envers la néomycine et la bacitracine; les trois variants possèdent un taux d'acide ribonucléique supérieur à celui de la souche d'origine; le variant obtenu avec la cobalamine fermente constamment, à la différence de la souche d'origine, le saccharose, le mannitol et le dulcitol, tandis qu'il diminue l'intensité de la production d'acétylméthylcarbinol; la formation de l'acidité lactique par ce variant n'est que peu influencée par les antibiotiques présents dans les milieux, et ne dépend que de la rapidité de son développement.

ORIGINE DES PRODUITS UTILISÉS

Antibiotiques

Specia :
Pénicilline G. Auréomycine chlorhydrate.
Diamant :
Streptomycine sulfate. Bacitracine. Néomycine.
Uclaf :
Chloramphénicol.
Clin-Pfizer :
Terramycine.
Coopération pharmaceutique française :
Tyrothricine.

Vitamines

Biochimiques Roche :
Vitamine B 1 (aneurine, thiamine); vitamine B 2 (lactoflavine); vitamine B 6 (adermine, pyridoxine chlorhydrate, pyridoxol); vitamine PP (amide nicotinique); pantothénate de calcium; méso-inositol; acide folique; biotine.
Coopération pharmaceutique française :
Vitamine B 12 (cyanocobalamine).

Produits biologiques

Organotechnie :
Hydrolysat de caséine; peptone pancréatique; poudre de cervelle.
Institut Pasteur :
Sérum sanguin.
Milieu glucosé tamponné.
Milieu de Clark et Lubs.

Produits chimiques divers

Coopération pharmaceutique française :
Ribonucléinate de sodium.
Biochimiques Roche :
1 (—) cystéine; glutathion; arginine chlorhydrate; protamine sulfate.
Industrie biologique française :
Désoxycorticostérone.
Institut Pasteur :
Suspension de réductose.
Solutions de glucides et alcools polyvalents.

BIBLIOGRAPHIE

1. Albert (A.) & Rees (C. W.). — *Nature (London)*, 1956, **177**, n° 4505, 433.
2. Alexander (H. E.) & Leidy (G.). — *J. Expl. med.*, 1953, **97**, 17.
3. Alimchandani (H. R.) & Sreenivasan (A.). — *Proc. Indian Acad. sci.*, 1957, **45 B**, 27.
4. Arora (K. L.) & Krishna Murti (C. R.). — *J. Sci. Industr. Res. B. India*, 1955, **14**, n° 3, 66.
5. Banic (S.). — *Schweiz Z. allg. Pathol. Bakteriol.*, 1958, **21**, n° 1, 54.
6. Beljanski (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 80.
7. Beljanski (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 402.
8. Beljanski (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 756.
9. Berkman (S.), Henry (R. J.) & Housewright (R. D.). — *J. Bact.*, 1947, **53**, 567.
10. Berkman (S.), Henry (R.-J.), Housewright (R. D.) & Henry (J.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, **68**, 65.
11. Berkman (S.), Housewright (R. D.) & Henry (R. J.). — *J. Immunol.*, 1949, **51**, 359.
12. Berridge (N. J.). — *Biochem. J.*, 1949, **43**, 486.
13. Boulanger (P.) & Montreuil (J.). — *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, XV[e] série. Masson, édit., Paris, 1953, 131.
14. Boyer (F.) & Sureau (B.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, **36**, 1241.
15. Brisou (B.). — Thèse médecine, Bordeaux, 1957.
16. Brody (T. M.) & Bain (J. A.). — *J. Pharm. and Exper. Therap.*, 1951, **103**, 338.
17. Bruni (A.). — *Arch. Sci. biol. Ital.*, 1956, **40**, 398.
18. Caspersson (T.). — *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1947, **1**, 127.
19. Cavalitto (C. J.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **164**, 29.
20. Cavalitto & coll. — *J. Bact.*, 1945, **50**, 61.
21. Cavalli (L. L.). — Aspects génétiques de la résistance aux antibiotiques. Symposium sur le mode d'action des antibiotiques. II[e] Congrès international de biochimie, Sedes, édit., Paris, 1952.
22. Chatterway (F. W.), Hall (D. A.), Happold (F. C.) & Holdsworth (E. S.). — *Nature*, 1949, **164**, 314,

23. Chouard (C. H.). — *Rev. pathol. génér. et physiol. clin.*, 1959, n° 705, 271
24. Collins (R. J.), Ellis (B.), Hansen (S. B.), McKenzie (H. S.), Moualin (R. J.), Petrow (V.), Stephenson (O.) & Sturgeon (B.). — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1952, **4**, 693.
25. Conner (R. L.) & Van Wagendonk (W. J.). — *J. Gen. Microbiol.*, 1955, **12**, 31.
26. De Freitas (G.), Pereira (N. A.) & Cardiso (H. T.). — Intern. Congr. Microbiol. Abstr. of papers Vth Congr. Rio de Janeiro, 1950, **37**.
27. Di Raimondo. — *Internat. Zschr. Vitaminforsch.*, 1951, **22**, 1.
28. Di Raimondo (F.), Orabona (M. L.) & Albano (O.). — *Boll. Ist. Sieroterap. milan.*, 1953, **32**, 118.
29. Dony-Crotteux (J.). — *J. Pharm. Belg.*, 1957, **12**, n° 5-6, 179.
30. Drouhet & Kepes. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 168.
31. Drouhet & Kepes. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 174.
32. Dubnoff (J. W.) & Bartron (E.). — *Arch. Biochem. Biophys. U.S.A.*, 1956, **62**, 86.
33. Dufrénoy (J.) & Pratt (R.). — *J. Bact.*, 1947, **53**, 657.
34. English (A. R.) & Mc Coy (E.). — *J. Bact.*, 1951, **62**, 19.
35. Faguet (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **74**, 75.
36. Faguet (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 296.
37. Folkers & coll. — *Science*, 1948, **108**, 634.
38. Foster (J. W.) & Pittillo (R. F.). — *J. Bact.*, 1953, **65**, 361.
39. Fouts (J. R.) & Brodie (B. B.). — *J. Pharmacol. Exper. Therap. U.S.A.*, 1957, **119**, n° 2, 197.
40. Frieden & Frazier. — *Arch. Biochem.*, 1947, **15**, 265.
41. Gale (E. F.). — *Nature*, 1946, **158**, 676.
42. Gale (E. F.). — *Bull. Johns Hopkins hosp.*, 1948, **142**, 239.
43. Gale (E. F.) & Folkes (J. P.). — *Biochem J.*, 1953, **53**, 493.
44. Gale (E. F.) & Rodwell (A. W.). — *J. Gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 127.
45. Goret (P.), Joubert (L.) & Saurat (P.). — *Rev. Pathol. comparée*, 1951, n° 631 et 632, 427.
46. Grelet (N.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 263.
47. Gros (F.), Machebœuf (M.), Lacaille (P.) & Rybak (B.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1949, **228**, 718.
48. Gros (F.), Machebœuf (M.), Rybak (B.) & Lacaille (R.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 246.
49. Gros (F.) & Rybak (B.). — *Helv. Chim. Acta*, 1948, **31**, n° 6.
50. Gros (F.), Rybak (B.), Machebœuf (M.) & Rambech (U.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1948, **226**, 1550.
51. Grossman (L.) & Hawkins (G. R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, Pays-Bas, 1957, **26**, 657.
52. Grunberger (D.), Hess (V. F.) & Sorm (F.). — *Collect. czechosl. Chem. Communic.*, 1956, **21**, n° 4, 932.

53. Hahn (F. E.). — Mode of action of antibiotics *in* Biochemistry of Antibiotics, 4th Internat. Congress of Biochemistry, Vienna 1958, volume V. 1 vol., Pergamon press, 1959.
54. Hahn (F. E.) & Wisseman (C. L.). — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1951, **76**, 533.
55. Harper & coll. — *Arch. of Biochem.*, 1951, **31**, 328.
56. Hayano (M.) & Dorfman (R. I.). — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1951, **54**, 608.
57. Hendlin & coll. — *Science*, 1950, **111**, 541.
58. Hershey (A. D.). — *J. gen Physiol., U. S. A.*, 1954, **38**, 145.
59. Hinglais (H.) & Langlade (Y. M.). — *Presse médicale*, 1955, **63**, n° 47, 989.
60. Hopps (H. E.), Wisseman (C. L. Jr.), Hahn (F. E.), Smadel (J. E.) & Ho (R.). — *J. Bact. U.S.A.*, 1956, **72**, n° 4, 561.
61. Hotchkiss (R. D.). — *Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1951, **16**, 457.
62. Hotchkiss (R. D.). — Symposium sur le mécanisme d'action des antibiotiques. II[e] Congrès international de Biochimie, 1 vol., Sedes, édit., Paris, 1952.
63. Hotchkiss (R. D.). — *Ann. New-York Acad. Sc.*, 1950, **53**, 13.
64. Hunter (T. H.) & Baker (K. T.). — *Science*, 1949, **110**, 423.
65. Iverson (W. P.) & Waksman (S. A.). — *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1952, **38**, 843.
66. Jacquet (J.). — *Rev. Path. gén.*, 1952, **52**, 557.
67. Jacquet (J.). — *Rev. Méd. Vét.*, 1953, **129**, 803.
68. Jacquet (J.) & coll. — *C. R. Acad. Agric.*, 1951, **36**, 189.
69. Jacquet (J.) & coll. — *C. R. Acad. Agric.*, 1951, **37**, 465.
70. Jacquet (J.) & M[me] Steeg. — *Ann. Falsif. et fraudes*, 1953, **46**, 5.
71. Kammerer (H.) & Eberle (A.). — *Klin. Woschenschr.*, 1952, **30**, 1083.
72. Kayser (F.) & Pouteau-Thouvenot (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 1718.
73. Klimek (J. W.), Cavalitto (C. J.) & Bailey (J. H.). — *J. Bact.*, 1948, **55**, 139.
74. Korotjaev (A. I.). — *Mikrobiologija S.S.S.R.*, **25**, n° 4, 451.
75. Krampitz & Werkman. — *Arch. of Biochem.*, 1947, **12**, 57.
76. Lambin (S.) & Robert (M.). — *Ann. pharm. franç.*, 1951, **9**, 103.
77. Latterrade, Auger & Macheboeuf. — *Ann. Institut Pasteur*, 1951, **81**, 634.
78. Lederberg (J.). — *J. Bact.*, 1957, **73**, 144.
79. Lederberg (J.) & Lederberg (E. M.). — *J. Bact.*, 1952, **63**, 399.
80. Lester (G.) & Hechter (O.). — *J. Bact.*, 1958, **76**, 365.
81. Letourneur (G.). — Diplôme d'Etudes supérieures de Sciences naturelles (Microbiologie), Caen, 1959.
82. Levy (B.), Levison (V.) & Shade (A. L.). — *Arch. Biochem.*, 1950, **27**, 34,

83. Lichstein (H. C.) & Gilfillan (R. F.). — *Proc. Soc. Exper. Biol. et Med.*, 1951, **77**, 459.
84. Machebœuf (M.) & Gros (F.). — *Exp. Ann. Bioch. Médic.*, XII[e] série, Masson, édit., Paris, 1951, 141.
85. Machebœuf (M.) & Gros (F.). — *J. Méd. Bordeaux*, 1953. **130**, 368.
86. Mackaness (G. B.) & Smith (N.). — *Ann. Rev. Tuberc.*, 1953, **67**, 322.
87. Malmgren (B.) & Heden (C. G.). — *Acta Microbiol. Path. Scand.*, 1947, **24**, 417.
88. Malmgren & Heden. — *Acta Microb. Scand.*, 1948.
89. Manil (P.). — Microbes et actions microbiennes. 1 vol., Desoer, édit., Liège, 1945.
90. Mannino (N.) & Pipitone (V.). — *Boll. Ist. Sieroterap. milan.*, 1955, **34**, 374.
91. Mannino (N.) & Pipitone (V.). — *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1954, **30**, 308.
92. Marmur (J.) & Hotchkiss (R. D.). — *J. Biol. Chem. U.S.A.*, 1955, **214**, 383.
93. Martin-Hernandez (D.). — *Rev. esp. Fisiol.*, 1956, **12**, 117.
94. Martin-Hernandez (D.). — *Rev. esp. Fisiol.*, 1956, **12**, 93.
95. Matkovics (B.). — *Naturwissenschaften Dtsch.*, 1957, **44**, n° 14, 400.
96. Mattick (A. T. R.) & Hirsch (A.). — *The Lancet*, 1947, n° 6452, 1.
97. Mc Laughan (J. M.) & Rogers (C. G.). — *Bacteriol. Proc. U. S. A.*, 1957, 119.
98. Mc Lintock & coll. — *J. Dairy Res.*, 1952, **19**, 187.
99. Mc Quillen (K.). — *Biochem. Biophys. acta*, 1951, **7**, 54.
100. Mc Veigh (I.) & Hobdy (C. J.). — *Am. J. Botany*, 1952, **39**, 352.
101. Meyer (J.), Malgras (J.) & Potin (J.-C.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 231.
102. Mika (L. A.), Braun (W.), Ciaccio (E.) & Goodlow (R. J.). — *J. Bact.*, 1954, **68**, 562.
103. Mondolfo (H.) & Mondolfo-Hounie (E.). — *Rev. as. Bioquim. argent.*, 1955, **20**, n° 97, 3.
104. Mondolfo (H.) & Mondolfo-Hounie (E.). — *Boll. Ist. sieroterap. milan.*, 1955, **34**, n° 9-10, 536.
105. Monod (J.). — *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, XVII[e] série, Masson, édit., Paris, 1955, 195.
106. Negri (R.) & Von Lorch (L.). — Caratteristiche delle preparazioni farmaceutiche contenenti lattobacilli e loro controllo. II[e] Congrès international de standardisation immunomicrobiologique, Roma, 1956.
107. Nickerson (W. J.), Merkel (J. R.) & Roland (F.). — *J. Infections Diseases*, 1953, **93**, 278.
108. Orla Jensen. — The lactic acid bacteria, 1 vol., Copenhagen, 1919.

109. Osteux (R.), Laturaze (J.), Burk (J.) & Boulanger (P.). — *J. Méd. Bordeaux*, 1953, **130**, 393.
110. Oxford (A. E.). — *Biochem. J.*, 1945, **39**, XIII.
111. Oxford (A. E.). — *Biochem. J.*, 1944, **38**, 178.
112. Owen (C. A.), Karlson (A. G.) & Zeller (E. A.). — *J. Bact.*, 1951, **62**, 53.
113. Pagano & coll. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1952, **79**, 359.
114. Paine (T. F.) & Lipmann (F.). — *J. Bact.*, 1949, **58**, 547.
115. Pandalai & Georges. — *Brit. Med. J.*, 1947, **210**.
116. Park (J. T.) & Johnson (M. J.). — *J. Biol. Chem.*, 1949, **179**, 585.
117. Park (J. T.) & Strominger (J. L.). — *Science U.S.A.*, 1957, **125**, 99.
118. Peterson (G. E.) & Johansson (K. R.). — *Antibiotics Ann.*, 1956-57, 518.
119. Popper (M.) & Lorian (V.). — *Rev. Tuberc. Fr.*, 1957, **21**, 536.
120. Potin (M.). — *Ann. Biol. Clin.*, 1953, n° 1-2, 77.
121. Pratt (R.). — *J. Amer. pharm. Ass. Sc. Ed.*, 1955, **44**, 621.
122. Pratt (R.) & Dufrénoy (J). — *J. Bact.*, 1948, **55**, 726.
123. Pratt (R.), Dufrénoy (J.) & Strait (L. A.). — *J. Bact.*, 1947, **54**, 719.
124. Princivalle (M.) & Von Lorch (L.). — Estratto dai Rendiconti dell' Istituto Superiore di Sanita, vol. XXI, Roma, 1958, 437.
125. Rashba (O.) & Galkina (T. O.). — *Mikrobiol. Zh.*, U.R.S.R., 1954, **16**, 27.
126. Rhymer (I.) & Wallace (G. I.). — *J. Bact.*, 1947, **54**, 521.
127. Richou R., Kourilsky (R.) & Chirol (C.). — *Rev. Immunologie*, 1956, **20**, 36.
128. Rybak (B.) & Gros (F.). — *Experientia*, 1948, **4**, 346.
129. Rybak (B.), Grumbach (F.) & Gros (F.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 237.
130. Samuels (P. J.). — *In* Résumé des communications du II° Congrès international de Biochimie, Paris, 1952, 93.
131. Saz (A. K.) & Slie (R. B.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 4626.
132. Schneider (W. C.). — *J. Biol. Chem.*, 1945, **161**, 293.
133. Scopes (A. W.) & Hinshelwood (C. N.). — *J. Chem. Soc.*, 1952, 1838.
134. Seeleman (M.) & Timm (F.). — *Milchwissenschaft. Dtsch.*, 1955, **10**, 113.
135. Seneca (H.) & Bergendahl (E.). — *Antibiot. Chemotherapy U.S.A.*, 1956, **6**, 41.
136. Sevcik (V.). — *Naturwissenschaften Dtsch.*, 1958, **45**, n° 6, 132.
137. Smith (G. N.), Worrel (C. S.) & Swanson (A. L.). — *J. Bact.*, 1949, **58**, 803.
138. Squire (E. W.) & Squire (E. N.). — *J. Bact.*, 1948, **55**, 766.

139. Strauss (E.), Dingle (J. H.) & Finland (M.). — *J. Immunol.*, 1941, **42**, 313.
140. Swenseid (M. E.), Wright (P. D.) & Berthell (F. H.). — *Proc. Soc. Exp. Med.*, 1952, **80**, 689.
141. Tayeau (F.), Dulong de Rosnay (C.), Martin-Dupont (C.) & Loste (H.). — *J. Méd. Bordeaux*, 1953, **130**, 397.
142. Tritsmans (E.) & Vanbeneden (F.). — *Antonie van Leewenhoek*, Nederl., 1956, **22**, 273.
143. Truhaut (R.), Lambin (S.) & Boyer (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 387.
144. Turpin (R.) & Velu (H.). — Thérapeutique antibiotique, 1 vol., Doin, édit., Paris, 1957.
145. Umbreit (W. W.). — *Amer. J. of Medic.*, 1955, **18**, 717.
146. Umbreit (W. W.). — *J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, 703.
147. Umbreit (W. W.) & Tonhazy (N.-E.). — *J. Bact.*, 1949, **58**, 769.
148. Van Meter (J. C.) & Oleson (J. J.). — *Science*, 1951, **113**, 273.
149. Von Euler (H.) & Heller (L.). — *Ark. Kemi*, 1948, **26 A**, n° 14, 224.
150. Wacker (A.), Pfahl (D.) & Schroder (I.). — *Z. Naturforschg.*, B, Dtsch., 1957, **12**, 510.
151. Whitehead (H. R.). — *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1793.
152. Winsten (S.) et Murray (T.-J.). — *Bacteriol. Proc. U.S.A.*, 1957, 36.
153. Wolff (R.). — *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, XIV° série, Masson, édit., Paris, 1952, 87.
154. Wolff (R.) & Brignon (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, **36**, 1125.
155. Woolley (D. W.). — *J. Biol. Chem.*, 1950, **185**, 293.
156. Wyss (O.) & Schaiberger (G. E.). — *J. Bact.*, 1953, **66**, 49.
157. Zimmerman (H. J.) & Humoller (F. L.). — *Ann. J. of Physiol.*, 1953, **175**, 468.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 9

PREMIÈRE PARTIE

Résumé des travaux antérieurs.

CHAPITRE PREMIER. — MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES 13

Pénicilline 14
Streptomycine 16
Chloramphénicol 17
Auréomycine 18

CHAPITRE II. — INHIBITION DES EFFETS ANTIBIOTIQUES 21

I. — Métabolites inhibiteurs ajoutés au milieu de culture et intervention des vitamines 22

II. — Transformation d'une souche sensible en souche résistante en l'absence de l'antibiotique, et rôle des vitamines 31

DEUXIÈME PARTIE

Recherches personnelles.

CHAPITRE PREMIER. — SOUCHES UTILISÉES ET MILIEUX DE CULTURE 37

CHAPITRE II. — INHIBITEURS DES ANTIBIOTIQUES 41

I. — Mesures de sensibilité des souches 41

II. — Métabolites inhibiteurs ajoutés au milieu de culture et essais avec les vitamines 42
A. — Ribonucléinate de sodium 42
B. — Cystéine 43

Pages

C. — Glutathion et cobalamine 45
D. — Sérum sanguin 45
E. — Complexes naturels 45
F. — Vitamines B 46
G. — Stéroïdes 47
H. — Réductose 48

III. — Comportement des principaux inhibiteurs d'antibiotiques vis-à-vis de quelques antibiotiques mineurs 53

IV. — Conservation des propriétés microbiennes lorsque l'antibiose est supprimée 54

V. — Discussion du chapitre II 56

VI. — Conclusions du chapitre II 58

CHAPITRE III. — RECHERCHES D'UNE OPPOSITION AUX ANTIBIOTIQUES EN RAISON D'UN CARACTÈRE BIOLOGIQUE PARTICULIER DES SOUCHES 60

I. — Examen de souches productrices d'antibiotiques. 60

II. — Essais d'entraînement avec les vitamines du groupe B 64

A. — Utilisation de vitamines du groupe B.. 64

1° Vitamines B 1, PP, B 12 64

2° Riboflavine, pyridoxol et pantothénate de calcium 67

3° Autres vitamines hydrosolubles du groupe B : méso-inositol, acide folique, biotine 68

B. — Etude des courbes de croissance de la souche d'origine et des variants 72

III. — Conclusions du chapitre III 78

CHAPITRE IV. — CONSÉQUENCES DE LA RÉSISTANCE ACQUISE.... 79

I. — Conservation de la résistance après repiquages sans vitamines 79

II. — Essais d'association de vitamines 80

III. — Essais des variants résistants envers divers antibiotiques autres que les quatre principaux.... 82

IV. — Etude de la teneur en acide ribonucléique des variants résistants 83

Pages

V. — Etude de la fermentation des glucides 86

VI. — Conclusions du chapitre IV 90

VII. — Discussion des chapitres III et IV 91

Conclusions générales 99

Origine des produits utilisés 101

Bibliographie 103

Bordeaux. — Impr. E. Drouillard, 3, place de la Victoire.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

STÉROLS DOUÉS D'ACTIVITÉS HORMONALES SEXUELLES DU CORTEX SURRÉNAL, DU PLACENTA ET DES GONADES. TRAITEZ DE LA FÉCONDATION, DE LA GESTATION, DE LA PARTURITION ET DE LA LACTATION.

EXAMINEZ SUCCINCTEMENT LA BIOGENÈSE ET DISCUTEZ DES VICARIANCES FONCTIONNELLES.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la thèse,

JACQUET.

Vu :

Le Doyen,

LOZAC'H.

Vu et permis d'imprimer :

Caen, le 3 juin 1960.

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,

DAURE.